

Mikrobiologie,  
Infektions- und Seuchenmedizin  
der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
(Vorstand: Prof. Dr. O.-R. Kaaden)

**Vergleichende strukturelle und funktionelle Charakterisierung  
des Glykoprotein H (gH)  
von equinen Herpesviren Typ 1 und Typ 4**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen  
Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Von  
Claudia Pace  
aus Castrovillari (Italien)

München 2004

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle  
Referent: Univ.-Prof. Dr. O.-R. Kaaden  
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl

Tag der Promotion: 23. Juli 2004

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Schrifttum</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Klinik und Pathogenese von Infektionen mit den equinen Herpesviren</b>	
	<b>Typ 1 und Typ 4 (EHV-1 und -4)</b>	<b>2</b>
<b>2.2</b>	<b>Klassifizierung und Struktur des EHV-1 und EHV-4</b>	<b>3</b>
<b>2.3</b>	<b>Glykoproteine bei Alphaherpesviren</b>	<b>5</b>
	2.3.1 Das Glykoprotein H bei HSV-1 und anderen Alphaherpesviren	8
	2.3.2 Das Glykoprotein H bei EHV-1 und EHV-4	15
<b>2.4</b>	<b>Replikation der <i>Alphaherpesvirinae</i></b>	<b>16</b>
	2.4.1 Regulation der Genexpression bei Herpesviren	16
	2.4.2 Der Replikationszyklus	17
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Material</b>	<b>23</b>
	3.1.1 Zellen	23
	3.1.2 Versuchstiere	23
	3.1.3 Bakterien und Plasmide	23
	3.1.3.1 Bakterien	23
	3.1.3.2 Plasmide	23
	3.1.4 Antikörper und Antiseren	24
	3.1.4.1 Monoklonale Antikörper	24
	3.1.4.2 Mit Peroxidase (POD) konjugierte Antikörper	24
	3.1.4.3 Mit ALEXA konjugierte Antikörper	24
	3.1.4.4 Mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugierte Antikörper	24
	3.1.5 Puffer, Lösungen und Reagenzien	24

3.1.6	Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien	37
<b>3.2</b>	<b>Methoden</b>	40
3.2.1	Zellen	40
3.2.1.1	Zellkultur	40
3.2.1.2	Kryokonservierung von Zelle	40
3.2.1.3	Herstellung von Zelllysaten	40
3.2.2	Virus	41
3.2.2.1	Verwendete Virusisolate	41
3.2.2.2	Virusvermehrung in Zellkultur	41
3.2.2.3	Virustitration	42
3.2.2.4	Präparation viraler DNA	42
3.2.2.5	Reinigung extrazellulärer Virionen	43
3.2.2.6	Trennung gereinigter Virionen in Hülle und Kapsid	43
3.2.2.7	Hemmung der DNA-Synthese in virusinfizierten Zellen mit Phosphonoessigsäure (PAA)	44
3.2.3	Expression viraler Gene in eukaryotischen Zellen	44
3.2.3.1	Transfektion mit PerFectin™	44
3.2.3.2	Herstellung rekombinanter Zelllinien	45
3.2.4	Herstellung rekombinanter Viren	46
3.2.5	DNA-Analyse	46
3.2.5.1	DNA-Konzentrationsbestimmung	46
3.2.5.2	Charakterisierung von DNA durch Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen	46
3.2.5.3	DNA-Charakterisierung durch DNA-DNA Hybridisierung (Southern Blot)	47
3.2.6	Klonierung viraler DNA	49
3.2.6.1	Amplifizierung von DNA-Abschnitten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	49
3.2.6.2	Aufreinigung und Präparation von DNA nach Restriktionsenzymverdau der PCR-Amplifikate	51
3.2.6.3	Modifikationen an den freien Enden von DNA-Fragmenten	51
3.2.6.4	Ligation von DNA-Fragmenten	52

3.2.6.5	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA	52
3.2.6.5.1	Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation mittels Hitzeschock	52
3.2.6.5.2	Transformation mittels Hitzeschock	53
3.2.6.6	Transformation von Bakterien mit BAC-DNA durch Elektroporation	54
3.2.6.6.1	Herstellung elektrokompetenter Bakterien	54
3.2.6.6.2	Transformation durch Elektroporation	54
3.2.6.7	Isolierung von Plasmid- und BAC-DNA aus transformierten Bakterien	55
3.2.6.7.1	Schnellpräparation bakterieller Plasmid-DNA durch Kochlyse	55
3.2.6.7.2	Schnellpräparation bakterieller BAC-DNA durch alkalische Lyse	55
3.2.6.7.2	Präparation größerer Mengen Plasmid- und BAC-DNA	56
3.2.6.7.3	Konservierung von Bakterien mit rekombinante Plasmid-und BAC-DNA	56
3.2.7	Proteinnachweis	57
3.2.7.1	Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)	57
3.2.7.1.1	Färbung intrazellulärer Proteine	57
3.2.7.1.2	Färbung von Proteinen auf der Zelloberfläche	57
3.2.7.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	58
3.2.7.3	Darstellung von Proteinen durch Coomassie Brilliant Blau-Färbung	60
3.2.7.4	Elektrotransfer und Immunodetektion von Proteinen (Western Blot)	61
3.2.8	Bakteriellen Expression und Aufreinigung des gH-Proteins von EHV-4	62
3.2.8.1	Expression	62
3.2.8.2	Aufreinigung	63
3.2.9	Immunisierung von Kaninchen zur Antikörpergewinnung	65
3.2.10	Untersuchung der Glykosilierung viraler Proteine	66
3.2.10.1	Deglykosilierung mit N-GlykosidaseF (PNGaseF)	66
3.2.10.2	Deglykosilierung mit EndoglykosidaseH (EndoH)	66
3.2.10.3	Inhibition der N-Glykosilierung mit Tunicamycin	67

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	68
<b>4.1</b>	<b>Herstellung rekombinanter Plasmide</b>	68
<b>4.2</b>	<b>Vergleich der Aminosäuresequenzen von EHV-1 und EHV-4 gH-Proteinen</b>	71
<b>4.3</b>	<b>Charakterisierung des gH-Proteins im Western-Blot</b>	74
4.3.1	Herstellung eines EHV-gH-spezifischen polyklonalen Antiserums	74
4.3.2	Nachweis des EHV-4 und EHV-1 gH-Proteins im Western Blot	75
4.3.3	Untersuchung gereinigter Virionen auf die Anwesenheit des gH-Proteins	77
4.3.4	Das gH-Protein ist Bestandteil der Virus-Hülle	78
4.3.5	Nachweis des gH-Proteins unter nicht denaturierenden Bedingungen	79
4.3.6	Nachweis der N-Glykosylierung des gH-Proteins nach Behandlung mit N-Glykosidase-F (PGNaseF) und Endoglykosidase-H (EndoH)	80
4.3.7	Kinetik der Expression des gH-Proteins im Verlauf einer EHV-4 und EHV-1 Infektion	82
4.3.8	Das gH gehört zur Klasse der $\gamma$ -Proteine	84
<b>4.4</b>	<b>Charakterisierung des gH-Protein in der indirekte Immunfluoreszenz (IIF)</b>	85
4.4.1	Etablierung und Charakterisierung einer gH-exprimierenden Zelllinie	85
4.4.2	Zelluläre Lokalisation des gH-Proteins in infizierten und transfizierten Zellen	90
4.4.3	Expressionskinetik des gH-Proteins in der indirekten Immunfluoreszenz	91
<b>4.5</b>	<b>Konstruktion und Charakterisierung von Deletionsmutanten</b>	91
4.5.1	Generierung eines EHV-1-gH negativer (pRacL11 $\Delta$ gH)	91
4.5.2	Charakterisierung des Genotyps von pRacL11 $\Delta$ gH in Agarosegel und Southern Blot	93
4.5.3	Das EHV-1-gH ist essentiell für die Virus Replikation <i>in vitro</i>	96
4.5.4	EHV-1 und EHV-4 gH-Proteine sind funktionell nicht austauschbar	97

<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	98
<b>5.1</b>	<b>Das gH-Protein bei EHV-4</b>	98
<b>5.2</b>	<b>Bedeutung des gH-Gens für die Virusreplikation <i>in vitro</i></b>	102
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung/Summary</b>	105
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	108
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	119
<b>8.1</b>	<b>Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen</b>	119

## 1 Einleitung

Die equinen Herpesviren Typ 1 und 4 (EHV-1 und -4) gehören zur Familie der *Herpesviridae*, zur Subfamilie der *Alphaherpesvirinae* und zum Genus *Varizellovirus*. Sie zählen zu den wichtigsten viralen Krankheitserregern des Pferdes. Beide Viren sind verantwortlich für respiratorische Symptome. Insbesondere durch EHV-1 kommt es zu teilweise seuchenhaft auftretenden Aborten in den letzten Monaten der Trächtigkeit und in selteneren Fällen auch zu neurologischen Ausfallserscheinungen durch Ansiedlung der Viren im Zentralnervensystem.

Alle *Alphaherpesvirinae* zeigen untereinander einen sehr homologen Genomaufbau, so dass die durch die Viren kodierten Proteine sowohl strukturell als auch funktionell sehr ähnlich sein können. Die Übereinstimmung der Sequenzen von EHV-1 und EHV-4 ist besonders hoch und die Identität der Aminosäuresequenzen liegt, je nach Genprodukt zwischen 55 % und 96 % (Telford *et al.*, 1998). Dennoch weisen EHV-1 und EHV-4 erhebliche biologische Unterschiede auf, deren Mechanismen noch vollkommen unverstanden sind. So bleiben die EHV-4-Infektionen meist auf den Respirationstrakt beschränkt, während Aborte in erster Linie auf EHV-1-Infektionen folgen. *In vitro* unterscheiden sich EHV-1 und EHV-4 in solchen Parametern, wie der Ausprägung des zytopathischen Effekts, der Vermehrungskinetik und vor allem auch dem Spektrum an Zelllinien, die eine effiziente Replikation erlauben. Um diese Unterschiede nachzuvollziehen, ist ein Vergleich einzelner viraler Proteine der beiden Viren von großer Bedeutung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das noch sehr wenig untersuchte Glykoprotein H bei EHV-1 und EHV-4 zu charakterisieren und seine Bedeutung für die Virus-Replikation *in vitro* zu vergleichen. Dazu sollte das Glykoprotein H (gH) durch Untersuchungen mit dem EHV-1-Stamm RacL11 und einem virulenten EHV-4-Isolat *in vitro* identifiziert und die Lokalisation in infizierten Zellen bestimmt werden. Weiterhin sollten mögliche ko- und posttranslationale Modifikationen und Interaktionen des gH mit anderen viralen Proteinen untersucht werden. Durch die Generierung eines gH-negativen EHV-1 sollten erste Untersuchungen über die Funktion des Proteins in Zellkultur durchgeführt werden, um herauszufinden, wie wichtig das Protein für die Virus-Replikation *in vitro* ist und ob EHV-1- und EHV-4-gH vergleichbar sind.



## 2 Schrifttum

### 2.1 Klinik und Pathogenese von Infektionen mit den equinen Herpesviren Typ 1 und Typ 4 (EHV-1 und -4)

Herpesviren (herpein, *griech.* = schleichen; virus, *lat.* = Gift) sind im Tierreich weit verbreitete Krankheitserreger und konnten bisher bei jeder untersuchten Vertebratenspezies nachgewiesen werden. Von den mehr als 130 teilweise charakterisierten Herpesviren konnten fünf unterschiedliche equine Herpesviren aus Pferden, EHV-1 bis EHV-5, (Bryans, 1980) und drei aus Eseln, asinines Herpesvirus Typ 1 bis 3 (AHV-1 bis -3) (Browning *et al.*, 1988), isoliert werden. Infektionen mit den EHV-2 bzw. EHV-5 konnten bisher nicht mit einem bestimmten Krankheitsbild verbunden werden, während EHV-3 Auslöser des sog. Koitalexanthems ist (Wilks und Studdert, 1976; Allen und Bryans, 1977a; Allen *et al.*, 1977b; Bryans J.T., 1980).

EHV-1 und EHV-4 kommen weltweit endemisch vor und spielen als Ursache infektiöser Erkrankungen des Respirationstraktes (Rhinopneumonitis) und infektiöser Aborte eine dominierende Rolle (Allen und Bryans, 1986; Frey, 2003). Während EHV-4-Infektionen meist auf den Respirationstrakt beschränkt bleiben, führen EHV-1-Infektionen zu Spätaborten bzw. neurologischen Ausfallserscheinungen. Eine primäre Infektion, mit einer Inkubationszeit von 3 bis 10 Tagen, tritt vorwiegend bei Absatzfohlen und Jährlingen auf und verläuft als akute und fieberhafte Erkrankung der oberen Atemwege. Durch bakterielle Sekundärinfektionen kann es zu mukopurulenter Rhinitis, Pharyngitis und chronischem Husten kommen, die sich zur Pneumonie und Pleuritis weiterentwickeln können (Sutton *et al.*, 1998). Bei älteren Pferden treten klinische Manifestationen nur gelegentlich auf, z.B. infolge einer Neuinfektion oder nach Stresssituationen (wie Transport, Trächtigkeit, Geburt) durch Reaktivierung der latenten Infektion. Infolge einer systemischen Virusausbreitung kann eine Infektion während der Trächtigkeit, mit einer Inkubationszeit von 3 Wochen bis 4 Monaten, zu lebensschwachen Fohlen bzw. zu Spätaborten (8. bis 10. Monat) führen. Aborte können im Bestand Einzelfälle bleiben, oder aber seuchenhaft auftreten, auch "Abortsturm" genannt. Die Ausbreitung wird durch eine massive Ausscheidung des Virus mit Fruchtwasser, Eihäuten und mit dem Fetus begünstigt.

Infektionen mit EHV-1 erfolgen entweder aerogen oder durch direkten Kontakt. Nach einer primären Virusvermehrung im Nasenepithel und einer zellassozierten Virämie kann das Virus, nach lympho-hämatogener Ausbreitung, in den gesamten Organismus gelangen.

Für die sekundäre Ansiedlung bevorzugt EHV-1 unter anderem die Epithelzellen des Respirationstraktes und die Endothelzellen der Blutgefäße des Endometriums (Scott *et al.*, 1983; Slater *et al.*, 1994). Durch die Vermehrung des Virus kann es hier zur Zerstörung der Endothelzellen kommen und zur Ausbildung von thrombo-ischämischen Infarkten und Nekrosen. Die Unterversorgung der Plazenta fetale kann zum Tod des Fetus bzw. zum Abort führen (Allen *et al.*, 1999; Frey, 2003). Die Pathogenese neurologischer Ausfallserscheinungen nach EHV-1-Infektionen ist nach wie vor ungeklärt. Als Ursache für die sporadische oder epidemische auftretenden Myeloencephalitiden wird eine Thrombose infolge einer Infektion der Endothelzellen in Gehirn diskutiert (Edington *et al.*, 1986; Murphy *et al.*, 1999).

## 2.2 Klassifizierung und Struktur des EHV-1 und EHV-4

### Klassifizierung

Die equinen Herpesviren Typ 1 und 4 werden anhand der Struktur des Virions (Murphy, 1990) zur Familie der *Herpesviridae* gezählt. Die Familie wird nach den biologischen Eigenschaften in drei Subfamilien eingeteilt: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* und *Gammapherpesvirinae* (Roizman, 1981). EHV-1 und EHV-4 werden auf Grund des breiten Wirtsspektrums, des schnellen Replikationszyklus, der raschen Vermehrung in Zellkultur mit Zerstörung der infizierten Zellen und die Fähigkeit, eine latente Infektion zu etablieren, zur Subfamilie der *Alphaherpesvirinae* gezählt (van Regenmortel *et al.*, 2000). Weitere Vertreter dieser Subfamilien sind z.B. das Varizella-Zoster-Virus (VZV), der Erreger der Aujeszky'schen Krankheit (Pseudorabies-Virus, PRV), das Bovine Herpesvirus Typ 1 (BHV-1) aus dem Genus *Varizellovirus* und das Herpes Simplex Virus Typ 1 und 2 (HSV-1, HSV-2) aus dem Genus *Simplexvirus*.

### Struktur

Die Virionen der Herpesviren bestehen aus einem elektronendichten "Core", einem ikosaedrischen Kapsid, einem amorphen Tegument und einer Hülle. Die mit einer fibrillären Proteinmatrix assoziierte doppelsträngige, unsegmentierte DNA, das Core, wird von einem Kapsid umgeben. Das EHV-1-Kapsid ist aus 162 Kapsomeren aufgebaut und wird durch eine

unstrukturierte Proteinmatrix, das Tegument, mit der Virushülle verbunden. Letztere setzt sich aus Membranen zellulären Ursprungs, in die zahlreiche Glykoproteine eingelagert sind, zusammen. Elektronenmikroskopisch stellen sich die nach außen gerichteten Glykoproteine als "spikes" dar (Roizman und Pellet, 2001).

### Genomaufbau

Herpesviren werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Organisation innerhalb des Genoms in sechs Gruppen, A bis F, unterteilt. Diese Untergliederung bezieht sich auf die unterschiedlichen Verteilungsmuster, Anzahl und Größe interner und terminaler reiterativer Sequenzen: IR ("internal repeat") und TR ("terminal repeat"). EHV-1 und EHV-4 sowie PRV, VZV und BHV-1 werden der Gruppe D zugeordnet (Roizman, 1981). Das Genom dieser Gruppe besteht aus zwei singulären ("unique") unterschiedlich langen Sequenzen. Das kürzere Segment ("Unique short", U<sub>S</sub>) wird von zwei reiterativen Sequenzen flankiert und somit von der "Unique Long" (U<sub>L</sub>) Region getrennt.



#### **Abbildung 1:** Anordnung des Genoms der Gruppe D

U<sub>L</sub> = Unique Long-Region, U<sub>S</sub> = Unique Short-Region, IR = internal repeat, TR = terminal repeat

Die Sequenzen der reiterativen Bereiche sind identisch, jedoch liegen die Sequenzen in umgekehrter Orientierung vor. Durch Rekombination kann die U<sub>S</sub>-Region daher in zwei Richtungen bezüglich der festgesetzten U<sub>L</sub>-Region vorliegen. Dadurch kommt es zu zwei isomeren Genomformen. Diese liegen in einem äquimolaren Verhältnis vor und sind biologisch nicht zu differenzieren (Henry *et al.*, 1981; Whalley *et al.*, 1981; Roizman und Pellet, 2001). Obwohl das Genom von EHV-1 und EHV-4 eine hohe Homologie zeigt und die Identität der Aminosäure-Sequenzen (AS) je nach Genprodukt zwischen 55 % (Gen 76) und 96 % (Gen 42) liegt (Telford *et al.*, 1998), weisen die beiden Viren biologische Unterschiede auf. Die lineare doppelsträngige DNA von EHV-1 und EHV-4 wurde, für den Stamm Ab4p bzw. NS80567, vollständig sequenziert (Telford *et al.*, 1992; Telford *et al.*, 1998). Das EHV-1-Genom besteht aus 150223 bp, der G+C-Gehalt liegt bei 56,7 % und besitzt mindestens 80 offene Leserahmen ("open reading frames", ORFs), die für mindestens 76

unterschiedliche Proteine kodieren (Telford *et al.*, 1992). Das EHV-4-Genom ist mit seinen 145597 bp geringfügig kleiner als das von EHV-1, zeigt einen geringeren durchschnittlichen G+C-Gehalt (50,5 %) und besitzt mind. 79 ORFs, die für mind. 76 verschiedene Proteine kodieren. Durch Sequenzvergleich wurde gezeigt, dass die Anordnung der Gene beider equinen Herpesviren weitgehend kolinear mit der der anderen *Alphaherpesviren* (VZV und HSV-1) ist (Cullinane *et al.*, 1988).

## 2.3 Glykoproteine bei Alphaherpesviren

Während des Replikationszyklus werden herpesvirale Proteine, nach Transkription der DNA im Zellkern, im Zytoplasma translatiert. Es werden sowohl Strukturproteine, die in das Virion eingebaut werden, als auch Nichtstrukturproteine, die hauptsächlich regulatorische Funktionen in der viralen Replikation besitzen, exprimiert. Anhand ihrer Lokalisation wird innerhalb der herpesviralen Strukturproteine zwischen Hüll-, Kapsid- und Tegument-Proteinen unterschieden. Bei HSV-1 sind von den mehr als 30 bekannten Strukturproteinen mindestens 11 Glykoproteine (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM, gN) und zwei nicht glykosilierte-intrinsische Membranproteine (UL20 und US9) Bestandteil der Virushülle (Roizman und Knipe, 2001). Während der Infektion und den Replikationszyklus spielen virale Glykoproteine überall dort eine Rolle, wo Membranen miteinander interagieren. Membranglykoproteine zeichnen sich durch mind. eine hydrophobe Transmembrandomäne, die für die Verankerung in der Membran verantwortlich ist, und durch die Modifizierung ihrer Struktur durch Bindung von N-gebundenen Oligosacchariden aus. Ihre Synthese findet, wie die der zellulären Proteine, am rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) statt. Das neu gebildete Vorläuferprotein gelangt ins Lumen des ER und wird hier und später dann im Golgi-Apparat endgültig modifiziert. Die häufigste Modifizierung eines Proteins stellt die Glykosilierung dar, deren Art und Umfang durch die Primärstruktur des Proteins bestimmt wird. Man unterscheidet zwischen N-Glykosilierung und O-Glykosilierung. Bei herpesviralen Glykoproteinen findet die N-Glykosilierung am häufigsten statt. Dabei wird im Lumen des ER zunächst ein zentrales Oligosaccharid aus 14 Resten (zwei N-Acetylglucosamin-, neun Mannose- und drei Glucose-Reste) vom „*High-Mannose-Typ*“ auf den Stickstoffrest des Asparagins des Vorläuferproteins enzymatisch übertragen. Die unreifen Glykoproteine werden in Transportvesikeln vom ER zum Golgi-Apparat befördert. Im Golgi-Apparat werden die Vorläufer-Oligosaccharide durch Anfügen von weiteren Zuckermolekülen zu komplexen

Glykanen modifiziert (Doms *et al.*, 1993). Herpesvirale Glykoproteine werden nur selten durch O-Glykosilierung im Golgi-Apparat modifiziert (Roizman und Sears, 1996). Die Glykosilierungsprozesse sind für eine korrekte Faltung des Proteins und somit für die Ausbildung seiner Tertiärstruktur essentiell. Bei Herpesviren führt eine Hemmung der N-Glykosilierung, z.B. durch Tunicamycin, einem von *Streptomyces* synthetisierten Antibiotikums, zur Bildung von nicht infektiösen Virionen (Kousoulas *et al.*, 1983; Glorioso *et al.*, 1983). Durch nur zum Teil bekannte Mechanismen werden die Proteine im Golgi-Apparat sortiert und zu ihrem endgültigen Bestimmungsort transportiert. Einige der Glykoproteine, wie gI und gE, gH und gL oder gM und gN bilden Komplexe aus, die für die korrekte Prozessierung und den intrazellulären Transport der beteiligten Proteine essentiell sind (Flowers und O'Callaghan, 1992; Stokes *et al.*, 1996; Rudolph und Osterrieder, 02). Glykoproteine stellen bei Alphaherpesviren, wegen ihrer Lokalisation in der Virushülle, eine wichtige Rolle im Replikationszyklus dar.

Bei EHV-1 sind 9 (gB, gC, gD, gG, gH, gM, gK, gp2 pUL45) von den 13 bei EHV-1 bekannten Glykoproteinen (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM, gN, gp2, pUL45) strukturell und funktionell am genauesten untersucht (Osterrieder *et al.*, 1999). EHV-1-Glykoproteine, sowie deren HSV-1 Homologe, sind Bestandteil der Virushülle, mit Ausnahme des Produkts des Gens gp10, ein Tegumentprotein, das bei EHV-1 glykosiliert ist (Whittaker *et al.*, 1991).

Das Glykoprotein B (gB) ist innerhalb aller Herpesviren das am höchsten konservierte Glykoprotein (Robbins *et al.*, 1987). Bei EHV-1 stellt es, zusammen mit gC, gD, und gH, eines der wichtigsten Immunogen dar und ist eines der Hauptziele der humoralen Immunantwort. In Hamstern induziert das Protein die Bildung von neutralisierenden Antikörpern. Mäuse, die mit gB immunisiert wurden, wurden teilweise vor einer Infektion geschützt. Untersuchungen mit gB-negativen EHV-1-Mutanten zeigten, dass dieses Glykoprotein sowohl an der Penetration, als auch am "cell-to-cell-spread" beteiligt ist und für die Virusreplikation *in vitro* essentiell ist (Neubauer *et al.*, 1997).

Das Glykoprotein C (gC) stellt bei EHV-1, wie auch bei HSV-1, BHV-1 und PRV, das wichtigste nicht-essentielle Adsorptionsprotein dar und ist an der Freisetzung von infektiösen Virionen beteiligt (Osterrieder, *et al.*, 1999). Untersuchungen mit gC-negativen-EHV-1-Mutanten zeigten zusätzlich eine verzögerte Penetrationsgeschwindigkeit (Osterrieder *et al.*, 1999).

Das Glykoprotein D ist Bestandteil des Virions und ist für die Penetration und den "cell-to-cell-spread" essentiell. (Allen und Yeargan, 1987; Csellner *et al.*, 1999). gD-negative

Mutanten sind für Mäuse apathogen und induzieren eine protektive Immunität (Allen und Yeargan, 1987; Csellner *et al.*, 1999).

Die Glykoproteine gE und gI bilden einen heterodimeren Komplex, sind am "cell-to-cell-spread" beteiligt und sind für die Virusreplikation im Zellkultur nicht essentiell (Flowers und O'Callaghan, 1992; Matsumura *et al.*, 1996 und 1998).

Glykoprotein G Homologe sind in mehreren Alphaherpesviren gefunden worden, jedoch ist über Struktur und Funktion noch wenig bekannt. Bei EHV-4 sind drei unterschiedliche gG-Formen identifiziert worden: eine 68 und eine 12 kDa Virion-assoziierte Form und eine 60 kDa Form, die in den Zellüberstand abgegeben wird. Die 12 kDa Virion-assoziierte Form entspricht der C-terminalen Domäne und die 60 kDa der N-terminalen Domäne. Beide Formen stellen proteolytische Spaltprodukte der 68 kDa großen Form dar (Crabb *et al.*, 1992; Drummer *et al.*, 1998)

Das Glykoprotein M hat, als nichtessentiell Hüllprotein, Homologe bei allen Subfamilien der Herpesviren. Das gM erwies sich sowohl für EHV-1, wie auch für HSV-1, PRV und für das infektiöses Laryngotracheitis Virus (ILTV), als nicht essentiell für die Virusvermehrung "in vitro" (Baines und Roizman, 1991; MacLean *et al.*, 1991; Dijkstra *et al.*, 1996; Osterrieder *et al.*, 1996; Fuchs und Mettenleiter, 1999). Die gM-negativen Mutanten zeigen jedoch gegenüber Wildtypviren eine deutlich verzögerte Penetrationsgeschwindigkeit (bis 50%) und eine reduzierte Plaquegröße (Osterrieder *et al.* 1996). Die gM-negativen Mutanten sind "in vivo" attenuiert und schützen die geimpften Mäuse gegen eine nachfolgende Testinfektion (Neubauer *et al.* 1997a).

Das gp2-Glykoprotein, das nur bei EHV-1 und EHV-4 zu finden ist, spielt sowohl beim Adsorptions- als auch beim Penetrations-Prozess eine Rolle, ist aber nicht essentiell für die Replikation "in vitro" (Sun *et al.*, 1996). Untersuchungen im Mausmodell haben gezeigt, dass eine Impfung mit DNA-kodierendem gp2-Protein zur Bildung von neutralisierenden Antikörpern gegen EHV-1 führt. Nach einer intranasalen Infektion zeigten die geimpften Tiere, im Vergleich zu den Kontrolltieren, eine schnellere Eliminierung des Virus aus der Lunge (Learmonth *et al.*, 2003).

### 2.3.1 Das Glykoprotein H (gH) bei HSV-1 und anderen Alphaherpesviren

Das für das Glykoprotein H (gH) kodierende Gen liegt auf dem 22. ORF innerhalb der U<sub>L</sub> ("unique long")-Region des HSV-1 Genoms. Entsprechende Leserahmen, die für das gH-Homolog kodieren, wurden bei allen Subfamilien gefunden. Bei den *Alphaherpesvirinae* wurden gH-Homologe bei HSV-1 und -2, EHV-1 und -4, BHV-1, VZV, PRV und beim Virus der Marek'schen Krankheit (MDV), bei den *Betaherpesvirinae* beim Humanen Cytomegalovirus (HCMV), humanen Herpesvirus Typ 6 (HHV-6) und bei den *Gammaherpesvirinae* beim Epstein-Barr-Virus (EBV) und Herpesvirus Saimiri (HVS) identifiziert (Browne *et al.*, 1996; Gompels und Minson, 1986; McGeoch und Davison, 1986; McGeoch *et al.*, 1988; Keller *et al.*, 1987; Cranage *et al.*, 1988; Heineman *et al.*, 1988; Gompels *et al.*, 1988; Nicolson *et al.*, 1990; Meyer *et al.*, 1991; Roberts *et al.*, 1991; Klupp und Mettenleiter, 1991; Wu *et al.*, 1999;). Die Lokalisation des gH-kodierenden Gens ist innerhalb der Herpesviren konserviert. Das Gen befindet sich im Genom nach dem Thymidin-Kinase Gen. Im Laufe von zahlreichen Untersuchungen wurde gezeigt, dass, obwohl die gH-Homologe in allen Subfamilien zu finden sind, sie in ihrer Funktion nicht absolut identisch sind.

### HSV-1

#### Struktur des gH bei HSV-1

Das HSV-1 gH-Gen ist innerhalb eines Genom-Bereichs lokalisiert, dessen Produkte in allen herpesviralen Subfamilien gefunden werden, und stellt nach dem Glykoprotein B (gB), das am stärksten konservierte Hüllprotein dar (Gompels *et al.*, 1988). Das U<sub>L</sub>22-Gen kodiert für ein Polypeptid von 838 Aminosäuren (AS) mit einem errechneten Translationsprodukt von 90,323 Da (McGeoch und Davison, 1986; Gompels und Minson 1986). Das gH-Protein zeigt den typischen Aufbau eines Klasse-I-Membranproteins. Durch die Analyse der Aminosäuresequenz konnte vorhergesagt werden, dass das gH aus einer N-terminalen Signalsequenz (die ersten 18 Aminosäuren), einer großen relativ hydrophilen extrazellulären Domäne (AS 19-804), einer stark hydrophoben transmembranen Ankersequenz (AS 805-824) und einer hoch geladenen intrazytoplasmatischen C-terminalen Domäne (AS 825-838) besteht (Gompels und Minson, 1986). Die Signalsequenz lenkt die Synthese des gH in den

sekretorischen "Pathway" und die Transmembran-Domäne verankert das gH an der Zellmembran (Dubin und Jiang, 1995). Es wurden 7 mögliche N-Glykosilierungsstellen in der extrazytoplasmatischen Domäne des HSV-1-gH identifiziert (Gompels und Minson, 1986; McGeoch *et al.*, 1988). Mit Ausnahme der Cysteinreste in der C-terminalen Hälfte der extrazellulären Domäne sind die AS-Sequenzen der gH-Homologe innerhalb der Herpesviren wenig konserviert (Gompels *et al.*, 1988). Durch Einsatz von anti-gH-monoklonalen Antikörpern (MAk) wurden in Western-Blot-Analysen von HSV-1-infizierten Zellen zwei verschiedene Formen des Proteins detektiert. Durch die im rauen endoplasmatischen Retikulum kotranslationale N-Glykosilierung der primären Translationsprodukte (90,3 kDa) entsteht ein Vorläuferprotein mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 100 kDa. Das reife Glykoprotein, das durch Modifikation im Golgi-Apparat entstanden ist, tritt in Form einer Bande mit apparentem Molekulargewicht von ca. 110 kDa auf (Buckmaster *et al.*, 1984; Gompels und Minson, 1989). "Pulse-chase"-Untersuchungen von HSV-1-infizierten Zellen haben gezeigt, dass die Prozessierungs-Kinetik des gH vergleichbar ist mit der von gB, gC und gD (Roberts *et al.*, 1991). In rekombinanten Zelllinien wird gH, wenn allein exprimiert, nicht vollständig glykosiliert, was zu einem fehlerhaften Transport des Proteins auf die Plasmamembran und zur intrazellulären Retention im rER führt. Im Gegensatz zu infizierten Zellen, wo das Protein in der indirekten Immunfluoreszenz (IIF) auch auf der Zelloberfläche detektierbar ist, ist das Protein in transient transfizierten Zellen diffus im Zytoplasma und um die Nukleusmembran herum lokalisiert (Foa-Tomasi *et al.*, 1991). Mittels temperatursensitiver (ts) gH-Mutanten (Weller *et al.*, 1983) wurde das Glykoprotein als Bestandteil extrazellulärer Virionen nachgewiesen (Desai *et al.*, 1988). Die vollständige Prozessierung, die Faltung, der Transport zur Zelloberfläche und der Einbau des Proteins in die Virionenhülle erfolgen jedoch nur in Gegenwart des U<sub>L</sub>1-Genprodukts, das Glykoprotein L (gL), mit dem das gH einen funktionellen heterodimeren Komplex bildet (Gompels und Minson, 1989; Roberts *et al.*, 1991; Foa-Tomasi *et al.*, 1991; Hutchinson *et al.*, 1992; Roop *et al.*, 1993), der aus jeweils einem Molekül gH und gL besteht (Peng *et al.*, 1998a). Die Interaktion der beiden Proteine erfolgt über eine nicht-kovalente Bindung (Hutchinson *et al.*, 1992). Die Tatsache, dass der gH-gL-Komplex innerhalb der Herpesviren hoch konserviert ist, deutet darauf hin, dass er eine zentrale Funktion in der Virus-Infektion besitzt. Die Expression der gH- und gL- Proteine erfolgt äquimolar. Die Komplexbildung, die kurz nach der Synthese der beiden Proteine erfolgt, ist für die richtige Faltung und den Transport beider Proteine essentiell (Hutchinson *et al.*, 1992). Eine Kotransfektion der beiden Proteine führt zu einer Lokalisation des gL-Proteins auf der Zelloberfläche, während, wenn das gL allein



exprimiert wird, es zu Abgaben des Proteins in das Zellkultur-Medium führt (Dubin und Jiang, 1995). Demzufolge wurde der gH-gL-Komplex als funktionelle Einheit für die Penetration des Virus in die Zelle verantwortlich gemacht. Das gL, in seiner Funktion als Chaperone, erleichtert die Faltung und den Transport des gH auf die Zelloberfläche, danach dissoziiert der gH-gL-Komplex (Gompels und Minson, 1989; Foa-Tomasi *et al.*, 1991; Roberts *et al.*, 1991; Hutchinson *et al.*, 1992; Roop *et al.*, 1993). Ein möglicher Interaktionsbereich zur Bildung des gH-gL-Komplexes wurde im Bereich der ersten 161 Aminosäuren des gL und der ersten 323 AS des gH vorgeschlagen (Peng *et al.*, 1998a). Die Tatsache, dass gL-Homologe in allen herpesviralen Subfamilien nachgewiesen wurden, deutet darauf hin, dass der gH-gL-Komplex eine wichtige Funktion während der Penetration des Virus in die Zelle besitzt. Das gL besteht, wie auch das gH, aus einer N-terminalen Signalsequenz (ersten 19 AS), es fehlt jedoch die hydrophobe Transmembran-Domäne. gL stellt daher kein integrales Membran-Glykoprotein dar, jedoch ist es durch die Interaktion mit gH an die Zellmembran assoziiert. Das gL-Protein besteht aus 224 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht von 25 kDa und weist eine N-Glykosilierungsstelle auf (McGeoch, 1988). Im Western Blot wurden mittels Antipeptid-Seren eine 30 kDa unprozessierte und eine 40 kDa reife Form des Glykoproteins nachgewiesen.

#### Funktion des gH bei HSV-1

Um Informationen über die Funktion von gH bei der Virus-Infektion und -Replikation zu erhalten, wurden zunächst Experimente mit temperatur-sensitiven Virusmutanten durchgeführt. Dabei dringen die Virusmutanten, auch bei einer nicht-permissiven Temperatur, effizient in die Zellen ein und replizieren sich dort. Während jedoch in den intrazellulären Virionen vorwiegend unreife Formen des gH nachgewiesen werden, wird das Protein in den extrazellulären Virionen nicht gefunden. Außerdem sind diese Virionen nicht infektiös (Desai *et al.*, 1988). Die Beobachtung, dass gH für die Virus-Infektiösität essentiell ist, wurde erst durch die Etablierung von Zelllinien, die das essentielle Protein *in trans* zur Verfügung stellen, und durch die Herstellung von HSV-1-gH-negativen Viren (nach Insertion der LacZ-Kassette auf *E. coli* in das vollständig deletierte gH-Gen) bestätigt. Durch die Herstellung von Insertions- und Deletions-Mutanten wurden Domänen in der extrazellulären Region identifiziert, die für die Virus-Infektiösität verantwortlich sind. Insertionen in der Nähe der Transmembran-Domäne (an den Aminosäuren 691-692, 709 und 791) führen bei gH-negativen Viren zu einer Reduktion der Infektiösität und zur Ausprägung der

Synzytien-Bildung (Galdiero *et al.*, 1997). Außerdem wurde , durch die fehlende Adsorption von Wildtypvirus an Zellen, die zuvor mit gH-negativen Viren inkubiert wurden, gezeigt, dass das gH eine wichtige Rolle in der Membran-Fusion, jedoch nicht in der Adsorption des Virus an die Zelle spielt (Forrester *et al.*, 1992). Eine Deletion des SVP Motivs der C-terminalen Domäne des gH und Punktmutationen von Valin an der 831. Position führen zu einer Aufhebung des synzytialen (*syn*-) Phänotyps (Wilson *et al.*, 1994). Dieser ist durch die extensive Fusion von infizierten Zellen und die Bildung von vielkernigen Zellen charakterisiert. Die Tatsache, dass das SVP-Motiv zur Virus-Penetration beiträgt (Browne *et al.*, 1996) aber keinen *syn*-Locus darstellt, erklärt seine Rolle in der Membran Fusion. Diese Regionen scheinen für eine effiziente gH-vermittelte Membran-Fusion essentiell zu sein. Diese Untersuchungen zeigten, dass unterschiedliche-Domänen des gH-gL-Komplexes an "cell-to-cell-spread" und Virus-Penetration beteiligt sind. Durch die Herstellung von Insertions- und Deletions-Mutanten wurden zwei essentielle funktionelle Domänen identifiziert, welche durch Mutation der konformationsabhängigen Regionen in der extrazellulären Domäne des gH-Proteins zu einer Resistenz gegen MAK führten. Die erste Domäne besteht aus mindestens 3 Epitopen, die sich an den Positionen 86 AS (Epitop I), 168 AS (Epitop II) und 329 AS (Epitop III) befinden. Sie ist 243 lang und wird durch das gL stabilisiert (Gompels und Minson, 1986; Gompels *et al.*, 1991; Galdiero *et al.*, 1997). Die zweite funktionelle Domäne besitzt zwei Epitope (IVa und IVb), die auf der Position 536-537 AS lokalisiert sind (Gompels *et al.*, 1991). Die langjährigen Untersuchungen führten zusammengefasst zu folgenden Ergebnissen: Die gH- und gL-Proteine sind, als heterodimerer Komplex, Bestandteile der Virus-Hülle und werden im Verlauf einer HSV-1-Infektion auf die Zelloberfläche transportiert (Hutchinson *et al.*, 1992). Der Komplex ist essentiell für die Fusion der viralen Hülle mit der Zellmembran und für den "cell-to-cell-spread" von Virionen (Fuller und Lee, 1992; Forrester *et al.*, 1992). Die Komplexbildung ist für die vollständige Prozessierung, die Faltung und den Transport der beiden Proteine essentiell (Roop *et al.*, 1993).

Die Bedeutung des HSV-gH-gL-Komplexes als Ziel des Immunsystems ist bislang wenig untersucht. Die bisherigen Untersuchungen haben zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt. Einerseits können MAK, die gegen den Komplex gerichtet sind, eine HSV-1-Infektion *in vitro* blockieren (Showalter *et al.*, 1981; Buchmaster *et al.*, 1984) und eine passive Immunisierung mit neutralisierenden Antikörpern, die gegen den gH-gL-Komplex gerichtet sind, verhindert *in vivo* die Ausbreitung einer Zosteriform-HSV-1-Infektion (Simmon und Nash, 1985;

Forrester *et al.*, 1991). Andererseits führten Immunisierungen mit rekombinanten gH- und gL-Proteinen (Ghiasi *et al.*, 1992 und 1994 a, b) oder mit in rekombinanten Vaccinia-Viren exprimierten gH, gL und gH-gL (Forrester *et al.*, 1991; Browne *et al.*, 1996) zu keinem vollständigen Schutz gegen eine HSV-1-Infektion. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein in eukaryotischen Zellen exprimierter Komplex Mäuse gegen eine letale HSV-1-Testinfektion schützt (Peng *et al.*, 1998b).

## **PRV**

Das primäre Translationsprodukt des gH-Gens beim PRV ist ein Polypeptid aus 686 AS mit einem errechneten Molekulargewicht von 71,9 kDa. Durch die Analyse der Aminosäuresequenz konnte gezeigt werden, dass das gH-Protein mit einer N-terminalen hydrophoben Signal-Sequenz, einer C-terminalen Transmembran-Domäne und einer intrazytoplasmatischen-Region den typischen Aufbau eines Glykoproteins zeigt. Es wurden 3 mögliche N-Glykosillierungsstellen in der extrazytoplasmatischen Domäne des Proteins identifiziert. Verglichen mit anderen Herpesviren weist die AS-Sequenz von PRV-gH mit einer Homologie von 39 % zu BHV-1, 32 % zu EHV-4 und VZV, 28 % zu HSV-1, 32 % zu HCVMV und 19 % zu EBV einen geringen Konservierungsgrad auf (Klupp und Mettenleiter, 1991). In aufgereinigten Virionen wurde nach Western-Blot-Analysen das gH-Protein in Form einer Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 95 kDa nachgewiesen. Eine Reduktion um 5 kDa bzw. 19 kDa des Molekulargewichts nach Behandlung der aufgereinigten Virionen mit Endoglykosidase H bzw. mit N-Glykosidase F (PNGase F) zeigte, dass es sich beim gH um ein durch N-Glykosilierung modifiziertes Protein handelt (Klupp *et al.*, 1992). Die Tatsache, dass die Expression des Proteins in rekombinanten Vaccinia-Viren zu einer unvollständigen Prozessierung des gH-Proteins führt, lässt vermuten, dass auch hier, wie bei HSV-1, das gH einen heterodimeren Komplex mit dem gL-Protein bildet. Das gL-Protein besteht aus 156 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht von 16,5 kDa. Es besitzt, im Gegensatz zur HSV-1-Homologen, keine Konsensussequenz für eine N-Glykosilierung. Die Behandlung mit Neuraminidase und O-Glykosidase ergab allerdings Hinweise auf eine Modifikation des Proteins durch O-Glykosilierung. Das gL ist ein struktureller Bestandteil der Virushülle und für die Virus-Infektiösität essentiell (Klupp *et al.*, 1994).

Um die Funktion des gH-Proteins zu charakterisieren, wurde zunächst eine gH-negative Mutante auf einer komplementierenden Zelllinie isoliert. Dabei wurde gezeigt, dass, wie bei HSV-1, das gH-Protein für den Virus-Replikationszyklus essentiell ist und es sowohl bei der Penetration als auch beim "*cell-to-cell-spread*" eine wichtige Rolle spielt (Peeters *et al.*, 1992). Außerdem wurde gezeigt, dass, wie auch bei HSV-1, die Lokalisation des gL-Proteins in der Virushülle von der Expression des gH-Proteins abhängig ist. Da das gH mit dem gL einen Komplex bildet, war es notwendig, auch die Funktion des gL-Proteins zu definieren. Dazu wurde das gesamte gL-Gen durch Insertion einer *LacZ*-Kassette deletiert. Auf Vero-Zellen zeigte die Mutante einen deutlich reduzierten "*cell-to-cell-spread*". Die von dem rekombinanten Virus gebildeten Plaques enthielten nur 2 bis 10 infizierte Zellen. Dieser Defekt wurde auf einer gL-komplementierenden Zelllinie kompensiert. Dies beweist, dass das Protein für einen effizienten "*cell-to-cell-spread*" im Zellkultur essentiell ist. Um den Wachstums-Defekt genau zu untersuchen, wurden Einschnitt-Wachstumskinetiken der Virusmutante und des Wildtypvirus auf Vero-Zellen und auf gL-komplementierenden Zelllinien verglichen. Während Infektionen auf komplementierenden Zelllinien keinen Wachstumsunterschied zwischen den beiden Viren zeigen, führt eine gL-negative Virus-Infektion auf Vero-Zellen zu keiner Plaque-Bildung. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das gL für die Virus-Replikation essentiell ist. Um die Funktion des gL bei der Penetration zu überprüfen, wurden die Penetrations-Eigenschaften von gB-, gH- und gL-negativen PRV-Mutanten auf komplementierenden Zelllinien untersucht. Dazu wurden die Zellen mit Polyethylenglycol (PEG), das die Membran-Fusion induziert, behandelt. Da die Behandlung mit PEG zu einer Steigerung der Infektiosität der Mutanten führte, wurde bestätigt, dass das gL eine essentielle Rolle in der Penetration spielt. Im Gegensatz zu HSV-1 wird gH bei PRV auch in Abwesenheit von gL in die Virushülle eingebaut, d.h., dass die Lokalisation des gH nicht von der Expression des gL abhängig ist. Obwohl das gH-Protein in gL-negativen Virionen prozessiert wird, reicht es allein jedoch nicht aus, um die Penetration zu induzieren. Zusammenfassend kann man also sagen, dass, obwohl beide Proteine einen Komplex bilden und beide eine essentielle Rolle in der Virus-Penetration spielen, sie trotzdem unterschiedliche Funktionen bei den Penetrations-Prozessen besitzen (Klupp *et al.*, 1997).

## **BHV-1**

Das gH-Gen befindet sich neben dem Thymidin-Kinase-Gen und kodiert für ein Polypeptid mit 842 Aminosäuren und einem errechneten Molekulargewicht von 90 kDa (van Drunen Littel-van den Hurk und Babiuk, 1996). Das Protein weist den typischen Aufbau eines Membran-Glykoproteins auf, in der extrazytoplasmatischen Domäne konnten 6 mögliche Konsensussequenzen für eine N-Glykosilierung identifiziert werden (Meyer *et al.*, 1991). Im Western Blot wurde das gH als struktureller Bestandteil des BHV-1-Virus in Form einer Bande mit apparentem Molekulargewicht von 108 kDa nachgewiesen. In Radioimmunpräzipitations-Versuchen wurde eine Expression des Proteins frühestens 2 h nach Infektion nachgewiesen und als  $\gamma_2$ -Protein klassifiziert.

Das gH-Protein bildet auch bei BHV-1 mit dem gL-Homolog einen Komplex, welcher ausschließlich für die Prozessierung und den Transport des gH-Proteins, jedoch nicht für das gL selber essentiell ist (Khattar *et al.*, 1996). Im Western Blot wurde der gH-gL-Komplex unter nicht denaturierenden Bedingungen als Tetramer, welches aus je zwei gH- und gL Molekülen besteht, mit einem apparenten Molekulargewicht von 250 kDa detektiert (van Drunen Littel-van den Hurk *et al.*, 1996). Das gL-Protein wurde in Immunpräzipitations-Experimenten mit aufgereinigten Virionen und BHV-1-infizierten MDBK-Zellen als eine 16 bis 17 kDa große Proteinbande nachgewiesen. Außerdem wurde, nach enzymatischer Deglykosilierung, in diesem Protein nur eine Modifizierung durch O-Glykosilierung nachgewiesen werden (Khattar *et al.*, 1996).

Um die Funktion des BHV-1-gH-Proteins im viralen Vermehrungszyklus zu untersuchen, wurde ein rekombinantes Virus hergestellt. Dazu wurde das gesamte gH-Gen durch eine LacZ-Kassette ersetzt. Dabei wurde gezeigt, dass das BHV-1-gH essentiell für die Virusreplikation ist, und vor allem an der Penetration und am "cell-to-cell-spread" beteiligt ist. Obwohl die gH-negativen Viren nicht mehr infektiös waren, zeigten sie keinen Defekt in der Adsorption. Mittels PEG induzierter Fusion wurde gezeigt, dass auch andere Proteine, gB und gD, an der Virus-Penetration beteiligt sind (Meyer *et al.*, 1998).

### 2.3.2 Das Glykoprotein H (gH) bei EHV-1 und EHV-4

#### EHV-1

Während das gH bei EHV-4 noch nicht untersucht wurde, liegen zur Struktur des EHV-1-Homologes unvollständige Daten vor.

Das Gen 39 (gH) befindet sich neben dem Thymidin-Kinase-Gen (zwischen Nukleotid 71792 und 73738) und kodiert für ein Polypeptid mit 848 Aminosäuren (Robertson *et al.*, 1991; Telford *et al.*, 1992). Durch die Analyse der Aminosäuresequenz wurde vorhergesagt, dass das Protein die charakteristischen Merkmale eines Membran-Glykoproteins zeigt. In der extrazytoplasmatischen Domäne wurden 11 mögliche N-Glykosilierungsstellen identifiziert (Robertson *et al.*, 1991). Der Verdau von EHV-1-infizierten Zellen mit PNGase F führte zu einer Verschiebung des apparenten Molekulargewichts von 115 kDa zu 90 kDa, welches dem vorhergesagten Wert der unglykosilierten Form des Proteins entspricht (McGowan *et al.*, 1994). Auf Grund von bereits bei anderen Herpesviren (HSV-1, PRV, HHV6, VZV) vorliegenden Untersuchungen, die zeigten, dass die vollständige Prozessierung, Faltung und der Transport des gH-Proteins auf die Zelloberfläche nur in Gegenwart des gL-Protein erfolgen, wurden verschiedene Experimente durchgeführt, um die gH- und gL-Proteine von EHV-1 zu charakterisieren. Je nach Zelltyp und Expressionssystem zeigte das gH-Protein unterschiedliche Größen. Während in EHV-1-infizierten eukaryotischen Zellen das Protein ein apparentes Molekulargewicht von 115 kDa zeigte, wurde in mit rekombinanten Baculoviren infizierten Insekten-Zellen das gH als ein 105- und ein 110 kDa-Protein identifiziert. Abhängig von den unterschiedlichen Markierungszeiten (6, 12 und 24 h), wurden in EHV-1-infizierten COS-7-Zellen mittels Immunpräzipitation drei unterschiedliche Formen (120, 110 und 116 kDa) des gH-Proteins detektiert (Stokes *et al.*, 1996). Das gL-Gen, Gen 62, kodiert für 218 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht von 24,42 kDa (Telford *et al.*, 1992). Das Polypeptid zeigt zum HSV-1-gL eine Homologie von 23 % und besitzt nur eine mögliche N-Glykosilierungsstelle. Eine vollständige Prozessierung des gL ist, wie bei HSV-1, von der Expression des gH-Proteins abhängig. Das Vorläufer-Protein wurde als Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 21,5 -25 kDa detektiert. In infizierten Zellen zeigte das durch N-Glykosilierung modifizierte Protein ein Molekulargewicht von 38-40 kDa (Stokes *et al.*, 1996). Das gH bildet auch bei EHV-1 einen Komplex mit dem gL.

In den bisherigen Studien sind nur initiale Untersuchungen durchgeführt worden, da die verwendeten Seren zahlreiche unspezifische Reaktionen aufwiesen, was den Nachweis des Proteins und damit die Herstellung eines anti-gH-Antikörpers in Kaninchen schwierig macht.

Nach Immunsierung von Mäusen mit dem gH-gL-Komplex wurde ein niedriger Titer von neutralisierenden Antikörpern nachgewiesen. Der gH-gL-Komplex und auch das gH-Protein schützten die Mäuse jedoch nicht vollständig vor einer Infektion. Eine Immunisierung mit dem gL-Protein führte dagegen zu gar keinem Schutz (Kudreja *et al.*, 1998).

## **2.4 Replikation der *Alphaherpesvirinae***

### **2.4.1 Regulation der Genexpression bei Herpesviren**

Die virale DNA wird nach dem Transport in den Zellkern durch die zelluläre DNA-Polymerase-II transkribiert. Die entstandenen mRNAs werden anschließend im Zytoplasma in die viralen Struktur- und Nichtstruktur-Proteine übersetzt. Die Expression der viralen Gene verläuft kaskadenartig und die zahlreichen positiven und negativen *Feedback*-Mechanismen sorgen für eine zeitliche und quantitative Regulation. Entsprechend der zeitlichen Expression werden drei Gruppen von Genen unterschieden:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Gene (Roizman und Sears, 1996). Die "immediate early"- (IE-) oder  $\alpha$ -Gene werden bis 4 h *post infectionem* (p.i.) exprimiert. Sie werden unabhängig von der Synthese viraler Proteine durch die zelluläre DNA-Polymerase-II transkribiert. Die Expression der  $\alpha$ -Gene wird durch die Interaktion von viralen *trans*-Aktivatoren, wie das Tegumentprotein VP16, mit bestimmten Zellfaktoren, z.B. Oct-1, stimuliert (Campbell und Preston, 1987). Durch Cycloheximid (ein Antibiotikum das die Initiations- und Elongationsschritte der Proteinsynthese hemmt) kann die Expression der  $\alpha$ -Gene *in vitro* angehalten werden (Engelhardt *et al.*, 1996). Die Genprodukte der  $\alpha$ -Gene haben regulatorische Funktionen und aktivieren die Transkription der "early"- (E-) oder  $\beta$ -Gene (Smith *et al.*, 1992). Die E-Gene werden bis 8 h p.i. exprimiert und kodieren für Proteine, die primär im viralen DNA-Stoffwechsel, z.B. die Thymidinkinase und die DNA-Polymerase, essentiell sind. Die Expression der "late"- (L-) oder  $\gamma$ -Gene beginnt ab ca. 4 h p.i, sie kodieren hauptsächlich für die stark immunogenen Hauptstrukturproteine, die sowohl während als auch nach der DNA-Replikation synthetisiert werden. Die  $\gamma$ -Gene werden in zwei Subklassen unterteilt, die  $\gamma_1$ - und die  $\gamma_2$ -Gene, deren

Expression vom Ausmaß der viralen DNA-Synthese abhängt. Die Stärke der  $\gamma_1$ - oder "early late"-Proteinexpression (dazu gehören z.B. gB, gD, und gH) wird durch den Einsatz von DNA-Synthese-Inhibitoren (Phosphonoessigsäure, PAA) deutlich, aber nicht vollständig gehemmt. Im Gegensatz dazu werden  $\gamma_2$ -Gene, z.B. gC, bei einer vollständigen Inhibition der DNA-Synthese nicht mehr exprimiert (Honess und Roizman, 1974; Caughman *et al.*, 1985; Gray *et al.*, 1987; Bowles *et al.*, 2000; Roizman und Pellet, 2001).

Während der Latenzphase der Alphaherpesvirus-Infektion liegt die virale DNA als extrachromosomales Episom im Karyoplasma von Neuronen und Leukozyten vor. Im Gegensatz zum lytischen Zyklus, während dessen bis zu 80 Gene exprimiert werden, werden in der Latenzphase je nach Viren nur ein einziges oder mehrere Transkripte, die sog. "latency associated transkript" (LAT) exprimiert. LAT ist, durch die Hemmung der virusinduzierten Apoptose, für die Etablierung und Aufrechterhaltung der Latenz verantwortlich (Ciacci-Zanella *et al.*, 1999; Perng *et al.*, 2000) und spielt für eine effiziente Reaktivierung eine essentielle Rolle (Perng *et al.*, 1994).

## 2.4.2 Der Replikationszyklus

Die Replikation aller Alphaherpesviren läuft nach bisherigen Erkenntnissen einem einheitlichen Schema ab.

### Adsorption, Penetration und Transport des Nukleokapsids zum Zellkern

Für das Eindringen der Viren in die Zellen ist die Interaktion zwischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche und viralem Oberflächen-Glykoprotein die Voraussetzung. Man unterscheidet zwischen Adsorption, das so genannte "attachment", und Penetration, das sog. "entry". Fuller und Wen-chi-Lee (1992) entwickelten ein Model für das Eindringen von HSV-1 in der Zielzelle, welches ein Beispiel für die kaskadenartige Interaktion zwischen Bestandteilen der Virus-Hülle und der Zellmembran darstellt. Das Model schlägt fünf unterschiedliche Phasen vor, welche nach logischer, jedoch nicht nach zeitlicher Reihenfolge geordnet sind: Das initiale-"attachment", das stabile-"attachment", die Fusions-Initiation, der Fusions-Brücken-Expansion und die Freisetzung des Nukleokapsids in das Zytoplasma. Für die einzelnen Phasen sind jedoch die genaueren biologischen und biochemischen Mechanismen noch zu



klären. In der ersten Phase der Adsorption bindet das Glykoprotein C (gC) an das Heparansulfat-artige Proteoglykan auf der Zelloberfläche (WuDunn und Spear, 1989; Mettenleiter *et al.*, 1990; ). Heparansulfat-Modifikationen sind ubiquitärer Bestandteil von Zellmembranen vieler unterschiedlicher Zelltypen und spielen für die Adsorption und HSV-1-Infektion eine wichtige Rolle. Durch Heparin, ein Strukturhomolog von Heparansulfat, kann die Bindung von gC kompetitiv gehemmt werden (Karger und Mettenleiter, 1993; Osterrieder *et al.*, 1999). Diese Bindung kann bei HSV-1, aber nicht bei BHV-1 und PRV, auch durch das Glykoprotein B (gB) übernommen werden (Shukla und Spear, 2001). In der zweiten Phase kommt es zur Interaktion des Glykoprotein D (gD) mit zellulären Rezeptoren (Karger und Mettenleiter, 1993). Diese Rezeptoren, (Hve A-D = *herpesvirus entry mediator*, HIgR = *herpesvirus immunoglobulin-like receptor*), die zu unterschiedlichen Protein-Superfamilien gehören, können, entsprechend der unterschiedlichen Zelltyp-Verteilung, nicht von allen Alphaherpesviren in gleicher Weise genutzt werden (Spear *et al.*, 2000). Die zweite Phase des “*attachment*” wurde mittels Elektronenmikroskopie an Hand der unterschiedlichen Entfernung zwischen Virionen und Plasmamembran nachvollzogen (Granzow *et al.*, 1997). Nach der stabilen “*attachment*” der Virionen an die Zelloberfläche erfolgt die Penetration, bei der die Virushülle mit der Zellmembran verschmilzt und das Nukleokapsid zusammen mit den Tegumentproteinen in das Zytoplasma gelangen. Dieser Vorgang, der bei HSV-1 einen pH-unabhängigen Prozess darstellt, wird auch bei PRV durch gB, gD und den gH-gL-heterodimeren Komplex vermittelt (Ligas und Johnson, 1988; Rauh und Mettenleiter, 1991; Peeters *et al.*, 1992). Alle 4 Glykoproteine sind für diesen Prozess essentiell, jedoch ist die genauere Funktion der einzelnen Komponenten noch unbekannt. Grund dafür ist die Tatsache, dass kein Protein, wenn allein exprimiert, die pH-unabhängige Membranfusion induzieren kann. Es wird vermutet, dass das gD bei der Fusions-Initiation eine Rolle spielt. Die Bindung von gD mit den Zellrezeptoren führte dann zu einer Umverteilung bzw. Konformationsänderung der Struktur der viralen Proteine, so dass gB und der gH-gL Komplex die Verschmelzung der Virushülle mit der Zellmembran ermöglichen könnten (Roizman und Knipe, 2001). gD und gH haben unterschiedliche Funktionen während der Penetration. Das gD scheint vor allem am stabilen Adsorptions-Schritt, der vor der Fusion stattfindet, beteiligt zu sein, während das gH vor allem an den folgenden Membranfusions-Prozessen, und nicht an der viralen Adsorption beteiligt ist (Fuller und Spear, 1987; Forrester *et al.*, 1992). Bei EHV-1 wurde nachgewiesen, dass das Produkt des Gen 71, zusammen mit gB, gC, gD und gM an den Penetrationsvorgängen beteiligt ist (Sun *et al.*, 1996; Neubauer *et al.*, 1997; Osterrieder *et al.*, 1999).

Nach der Verschmelzung der Virushülle mit der Zellmembran gelangt das Kapsid mit dem Tegument in das Zytoplasma. Einige Tegument-Proteine verbleiben im Zytoplasma, um günstige Bedingungen für eine effiziente virale Replikation zu schaffen. Zum Beispiel wird durch das "vhs"-Protein (*virion host shutoff-Protein*) die Synthese von zellulären Proteinen durch Degradation von m-RNA blockiert. Andere Tegumentproteine werden zusammen mit dem Kapsid (z.B. Vp1/2) oder allein (VP16) entlang der Mikrotubuli, unter Nutzung des Dynein-Motors, zu den Nukleus-Poren transportiert (Sodeik *et al.*, 1997).

### Replikation viraler DNA

Nach dem intrazytoplasmatischen Transport sammeln sich die Nukleokapside an der Kernmembran, interagieren mit den Kernporen und setzen die virale DNA im Nukleus frei. VP1/2 (U<sub>L</sub>36), ein großes Tegument-Protein, spielt eine wichtige Rolle in der Freisetzung der DNA (Roizman und Knipe, 2001). Der Großteil der freigesetzten viralen DNA zirkularisiert im Kernplasma sofort zu Episomen (Poffenberger und Roizman, 1985), und wird durch die zelluläre RNA-Polymerase II transkribiert. Das Tegumentprotein VP16 (U<sub>L</sub>48), das auch als  $\alpha$ -TIF (*trans inducing factor*) bekannt ist, aktiviert in Zusammenarbeit mit bestimmten Zellfaktoren (z. B. Oct1) die Expression des viralen IE-Genpromotors. VP16 beschleunigt die Transkription, ist hierfür jedoch nicht essentiell. Die IE-Proteine haben wichtige regulatorische Funktionen und induzieren die Transkription von E-Proteinen ( $\beta$ -Proteine). Diese  $\beta$ -Proteine sind für die Virus-Replikation notwendig. Das virale Genom wird nach dem Prinzip eines "rolling circle" repliziert, d.h. dass die virale DNA als fortlaufende Matrize dient. Dabei entstehen lineare Konkatemere, die aus mehreren aneinander gereihten Kopien des Genoms bestehen. Die freien Enden der Konkatemere werden in die entstandenen Kapside eingefädelt und an einer *pac*-Signalsequenz innerhalb der IR-Bereiche abgeschnitten (Varmuza und Smiley, 1985). Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass die endgültige Zusammensetzung der Kapside im Nukleus stattfindet. In infizierten Zellen werden drei Sorten von Kapsiden, A-, B- und C-Kapside, gefunden. A-Kapside und B-Kapside besitzen keine DNA, jedoch enthalten B-Kapside in ihrem Inneren VP22a und VP21, zwei Gerüst ("*scaffold*")-Proteine, und eine virale Protease, das VP24. Diese innere Proteinschicht wird bei der Verpackung der DNA verdrängt. Die reifen C-Kapside enthalten das virale Genom (Roizman und Knipe, 2001).

### Egress

Um aus der infizierten Zelle zu gelangen, verlassen die reifen Kapside durch Knospung, "*budding*", an der inneren Kernmembran den Zellkern, werden dort umhüllt und sammeln sich im perinukleären Raum an. Dieser erste Schritt des "*egress*" wird durch die Interaktion zwischen Kapsid und Tegumentproteinen und zwischen Tegumentproteinen und viralen Proteinen, die in der inneren Kernmembran eingelagert sind, vermittelt. Neuere Erkenntnisse haben gezeigt, dass zwei hoch konservierte herpesvirale Proteine, die Produkte der Gene U<sub>L</sub>31 und U<sub>L</sub>34, eine wichtige Rolle im "*budding*"-Prozess an der inneren Kernmembran spielen. Beide Proteine bilden, sowohl bei HSV-1 als auch bei PRV, einen Komplex, der in der Kernmembran verankert ist. Durch Deletion einer oder beider Proteine wird die Umhüllung des Nukleokapsids drastisch reduziert, was zu einer Akkumulation unbehüllter Kapside im Nukleus führt (Mettenleiter, 2002). Bei HSV-1 wird die Effizienz dieses ersten Umhüllungsschritts durch das Produkt des U<sub>L</sub>11-Gens erhöht (Baines und Roizman, 1992). Über die weiteren Vorgänge der Virusreifung wurde die so genannte "*De-envelopment-Re-envelopment*" Theorie (Granzow *et al.*, 1997) aufgestellt worden. Durch Fusion der primären Hülle mit der äußeren Kernmembran bzw. mit der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) gelangen die im perinukleären Raum gelegenen Partikel in das Zytoplasma (Browne *et al.*, 1996; Skepper *et al.*, 2001; Mettenleiter, 2002). PRV-Virionen im perinukleären Raum unterscheiden sich in der Zusammensetzung der Tegument- und Hüllproteine von den reifen extrazellulären Viruspartikeln. Zum Beispiel wurde das U<sub>L</sub>31, ein primäres Tegumentprotein, und das U<sub>L</sub>34, ein primäres Hüllprotein, nur in den unreifen Virionen nachgewiesen (Mettenleiter, 2002). Die perinukleär gelegenen Virionen zeigten außerdem, im Gegensatz zu den intrazytoplasmatischen und extrazellulären Virionen, keine charakteristischen "*spikes*" (Granzow *et al.*, 1997). Während des Transports zum *trans-Golgi-Netzwerk* (TGN), lagern weitere Tegumentproteine an die Nukleokapside an. Durch die Interaktion der Tegumentproteine mit den Kapsiden einerseits, und mit den zytoplasmatischen Domänen der Glykoproteine andererseits, wird die Vollständigkeit der Nachkommenviren-Population gewährleistet (Mettenleiter, 2002).

Das Tegument hat eine sehr komplexe Struktur, es besteht aus mehr als 15 Proteinen, deren Funktion noch nicht vollständig geklärt ist. Die innere Schicht des Teguments zeigt eine ikosaedrale Symmetrie, die auf die Interaktion des ICP1-2- (U<sub>L</sub>36) mit dem ICP5 (U<sub>L</sub>19)-Protein, dem Hauptkapsidprotein, zurückzuführen ist. Sie wird von einer zweiten Schicht, die aus ICP32 (U<sub>L</sub> 37)-Protein besteht, umgeben. Das ICP32-Protein interagiert bei PRV mit dem Produkt des U<sub>L</sub>36-Gens. Beide Tegumentproteine sind innerhalb der

Herpesfamilie hoch konserviert und essentiell für die Virusreifung. Die weiteren Anlagerungsvorgänge der Tegumentproteine sind noch nicht vollständig definiert. Für die weitere Reifung von Virionen spielt das U<sub>L</sub>48-Gen eine große Rolle. Das Produkt dieses Gens macht den Hauptbestandteil des Teguments aus und ist an der Bildung von Virionen im Zytoplasma beteiligt. Die mit den Tegumentproteinen umhüllten Kapside werden zum TGN transportiert, dort erhalten sie weitere Tegumentproteine und durch "budding" ihre endgültige Hülle (Mettenleiter, 2002). Die viralen Glykoproteine werden im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat prozessiert und gelangen somit in die Membran des TGN (Whealy *et al.*, 1991; Browne *et al.*, 1996; Whiteley *et al.*, 1999; Skepper *et al.*, 2001). Der zweite Umhüllungsschritt, "re-envelopment", wird bei HSV-1 durch die Interaktion des U<sub>L</sub>49-Tegumentproteins mit der zytoplasmatischen Domäne der nicht essentiellen gE-gI und gM Glykoproteine initiiert (Mettenleiter, 2002). Die behüllten Virionen sammeln sich in Prälysosomen, die durch die Fusion von mehreren TGN-Vesikeln entstehen, und werden zur Zelloberfläche transportiert (Granzow *et al.*, 1997; Fuchs *et al.*, 1997). Die Fusion der Prälysosomen mit der Zellmembran führt zur Freisetzung der infektiösen Virionen in den Extrazellulärraum.

#### Direkte Infektionsausbreitung durch "cell-to-cell-spread"

Neben der extrazellulären Ausbreitung nutzen  $\alpha$ -Herpesviren den direkten Zellkontakt aus, um sich schneller und effektiver auszubreiten. Bei diesem noch unvollständig geklärten Vorgang, der auch als "cell-to-cell-spread" bekannt ist, stellt eine umschriebene Fusion der Plasmamembranen benachbarter Zellen (Spear, 1993a und b) und bzw. oder die Interaktion von viralen Proteinen mit speziellen Zellverbindungen, den "tight junctions", das zentrale Ereignis dar. Dieser Ausbreitungsmechanismus kann auch in Anwesenheit von neutralisierenden Antikörpern ablaufen, die nicht in der Lage sind, in die Zellzwischenräume zu gelangen (Hutchinson *et al.*, 1995). Am "cell-to-cell-spread" der  $\alpha$ -Herpesviren sind mehrere virale Membranglykoproteine beteiligt. Bei HSV-1 sind die Glykoproteine gB, gD, gH/gL an den Fusionsprozessen zwischen Virushülle und Zelloberfläche beteiligt, egal ob sie an der apikalen oder basolateralen Zellmembran erfolgen (Johnson und Huber, 2002). Der gE/gI heterodimer Glykoprotein-Komplex hat keine deutliche Funktion bei der Penetration extrazellulärer Virionen, und spielt vor allem beim "cell-to-cell-spread" in polarisierten Zellen eine Rolle, ohne aber essentiell zu sein (Johnson und Huber, 2002). Bei HSV-1 kommt

es während der Infektion zunächst zu einer Akkumulation von gE/gI im TGN, wo der Komplex zusammen mit gM am am “*re-envelopment*”-Prozess der Kapside beteiligt ist. Zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion gelangen gE und gI zu den basolateralen Zelloberflächen. Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass bestimmte Aminosäure-Motive für die Lokalisation von zellulären Proteinen in das TGN und an die basolateralen Zelloberflächen verantwortlich sind. Ähnliche Aminosäure-Motive wurden auch in der zytoplasmatischen Domäne von gE und gI nachgewiesen. Es wird vermutet, dass durch die Interaktion der zytoplasmatischen Domäne von gE-gI mit Bestandteilen zellulärer Verbindungen, den “*tight junctions*”, die Prälysosomen zur basolateralen Plasmamembran gelenkt werden. Durch die Interaktion des gD mit den “*tight junctions*” kann das Virus in die noch nicht infizierte Zelle penetrieren.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Material**

#### **3.1.1 Zellen**

- Rk13 (Kaninchennierenzellen, Zelllinie) ab der 60. Passage
- Edmin 337 (Equine Hautzellen, Zelllinie; Hübert *et al.*, 1996) ab der 40. Passage
- Vero C1008 (Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze) ab der 35. Passage

#### **3.1.2 Versuchstiere**

- Kaninchen, Chinchilla Bastards (Fa. Charles River, Deutschland)

#### **3.1.3 Bakterien und Plasmide**

##### **3.1.3.1 Bakterien**

- *E. coli* Stamm: DH5 $\alpha$ F' (Fa. Gibco BRL, Eggenstein)
- *E. coli* Stamm: DH10B
- *E. coli* Stamm: TOP10F' (LMG194) (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- *E. coli* Stamm: BL21 (Fa. Qiagen, Hilden)
- *E. coli* Stamm: M15 (Fa. Qiagen, Hilden)

##### **3.1.3.2 Plasmide**

- pTZ18R (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Schweden)
- pcDNAI/Amp (Fa. Invitrogen)
- pSV2-neo (von M. Büttner erhalten)
- pBADgIII (Fa. Invitrogen)
- pcDNA3.1myc-His+ (Fa. Invitrogen)
- pHA2 (Adler *et al.*, 2000 ; freundlicherweise von M. Messerle, Halle/Saale zur Verfügung gestellt)
- pACYC177 (Fa. Biolabs, New England)

### **3.1.4 Antikörper und Antiseren**

#### **3.1.4.1 Monoklonale Antikörper**

- 3F6 anti-Glykoprotein B (gB); monoklonaler Antikörper (Allen & Yeargan, 1987)
- Anti-c-myc monoklonaler Antikörper (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)
- 20C4 Anti-Glykoprotein D (gD) monoklonaler Antikörper (Allen und Yeargan, 1987)

#### **3.1.4.2 Mit Peroxidase (POD) konjugierte Antikörper**

- anti-mouse IgG (Fa. Sigma, München)
- anti-rabbit IgG (Fa. Sigma, München)
- Streptavidin POD (Fa. Roche Molekular Biochemicals, Mannheim)

#### **3.1.4.3 Mit ALEXA konjugierte Antikörper**

- anti-mouse IgG, Fluoreszenz-markiert (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 und 556 nm; Fa. Molecular Probes, Eugene, USA)
- anti-rabbit IgG, Fluoreszenz-markiert (Alexa Fluor<sup>®</sup> 556 nm; Fa. Molecular Probes, Eugene, USA)

#### **3.1.4.4 Mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugierte Antikörper**

- anti-Digoxigenin-AP (Fa. Roche Molekular Biochemicals, Mannheim)

### **3.1.5 Puffer, Lösungen und Reagenzien**

- Aceton (Fa. Roth, Karlsruhe)
- Agarose (Fa. Peqlab)  
0,8 bis 2 % (w/v) in 0,5 x Elektrophoresepuffer TAE
- Acrylamids-Stammlösung (Rotiophorese Gel 30):  
gebrauchsfertige, gasstabilisierte, wässrige 30 % Acrylamids-Stammlösung mit 0,8 % Bisacrylamid (Fa. Roth, Karlsruhe)
- Ammoniumpersulfat (Amper; Fa. BioRad, München):  
10 % (w/v) in A. dest. (Stammlösung)
- Ammoniumsulfat (Fa. Merck, Darmstadt)

- Antibiotika (den Bakterienkulturmedien zugesetzt):
  - 100 µg/ml Ampicillin (Endkonzentration; Fa. Sigma, München)
  - 25 ng/ml Kanamycinsulfat (Endkonzentration; Fa. Sigma, München)
  - 30 ng/ml Chloramphenicol (Endkonzentration; Fa. Sigma, Deisenhofen)
  - 50 µg/ml bis 100µg/ml Carbenicillin (Endkonzentration; Fa. Sigma, München)
- Aprotinin (Fa. Sigma, München)
- Arabinose (Fa. Sigma, München)
  
- BCA- Proteinbestimmungsreagenz (Fa. Pierce, Illinois)
- Block-Lösung Roti Immun (Fa. Roth, Karlsruhe)
- Blocking-Puffer für die indirekte Immunfluoreszenz:
  - 10% Roti-Immun in PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$
- Blocking-Puffer für Westernblot:
  - TBS-T mit 10 % (w/v) Magermilchpulver (Fa. AppliChem)
- Blockierungsreagenz für Southern-Blot (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)
- Bromphenolblau (Fa. Sigma, München)
- BSA (Bovines Serumalbumin; Fa. New England Biolabs)
- BSE-Puffer 10x:
  - 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
  - 5 % (w/v) SDS
  - 50 % (w/v) Sucrose
  - 70 mM EDTA, pH 8,0
- Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ ; Fa. Merck, Darmstadt)
- CIP (Calf Intestine Phosphatase; Fa. New England Biolabs)
- Chloroform (Fa. AppliChem)
- Coomassie Brilliant Blue R-250 (Fa. Sigma, München)
- Coomassie-Entfärbungs-Lösung :
  - 450 ml Methanol
  - 450 ml A. dest.
  - 100 ml Eisessig



- **Coomassie-Färbelösung:**
  - 1,25 g Coomassie Brilliant Blue R-250 (Fa. Sigma, München)
  - 225 ml Methanol
  - 225 ml A. dest.
  - 50 ml Eisessig
- **CSPD (für Southern-Blot)**
  - (3-(4-methoxyspirol [1,2-dioxethan-3,2`-(5`chloro)Tricyclo{3.3.1.1<sup>3,7</sup>}Decan]-4-yl) Phenylphosphat, Dinatriumsalz) (Fa. Roche Molekular Biochemicals, Mannheim)
- **Cycloheximid (Fa. Applichem)**
  - Stock Lösung 17 mg/ml in A. dest.
- **Deglykosilierungspuffer:**
  - 50 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH7,2
  - 20 mM EDTA, pH 8,0
  - 0,5 % (v/v) NP-40
  - 1 mM PMSF
  - 0,005 % (w/v) Aprotinin
  - 0,005 % (w/v) Leupeptin
  - 0,001 mg/ml TLCK
  - 0,003 mg/ml TPCK
- **DNA-Purification-Kit (Fa. Amersham)**
- **Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphate (dNTPs; Fa. Promega, Mannheim)**
- **DIG-High Prime (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)**
- **DMF (Dimethylformamid; Fa. Sigma, München)**
- **DMSO (Dimethylsulfoxid; Fa. Sigma, München)**
- **ECL Chemilumineszenz Detection Kit (Fa. Amersham, GB)**
- **EDTA (Ethylendiamintetraacetat; Fa. Serva, Heidelberg)**
- **Eisessig (Fa. Roth, Karlsruhe)**

- **Elektroelutionspuffer:**
  - 193 mM Glycin
  - 25 mM Tris
  - 10 % (v/v) Methanol
- **Elektrophorese-Puffer 1 (für SDS-PAGE)**
  - 193 mM Glycin
  - 25 mM Tris
  - 0,1 % (w/v) SDS in A. dest.
- **Elektrophorese-Puffer 2 (für Agarose Gelelektrophorese) 50fach konzentriert TAE**
  - 2 M Tris
  - 0,25 M Na-Acetat
  - 0,005 M EDTA
  - in A. dest. mit Eisessig auf pH 7,8 eingestellt
- **Endoglykosidase H (Fa. Roche, Mannheim)**
- **Ethidiumbromid (Fa. Sigma, München)**
- **Ethanol, absolut (EtOH abs, bei –20°C gelagert, Fa. Sigma, München)**
- **FKS (fetales Kälberserum; Fa. Biochrom)**
- **Formaldehyd, mind. 35% (Fa. Merk, Darmstadt)**
- **Formalin 10%, neutral gepuffert (Fa. Sigma, München)**
- **Formamid (Fa. Merk, Darmstadt)**
- **Freund'sches Adjuvans, complete (Fa. Sigma, München)**
- **Freund'sches Adjuvans, incomplete (Fa. Sigma, München)**
- **G-418 Sulfat (Genitacin; Fa. Calbiochem)**
- **Glycerin (Fa. Merk, Darmstadt)**
- **Glycerin/HBS:**
  - 15% (v/v) Glyzerin in 1 X HBS
- **Glycin (Fa. Roth, Karlsruhe)**
- **L-Glutamin (Fa. Sigma, München)**
- **Harnstoff (Fa. Applichem)**

- **HBS-Puffer (2x) für CaPO<sub>4</sub>-Transfektion:**
  - 50 mM HEPES
  - 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - 280 mM NaCl
  - auf pH 7,13 eingestellt
- **HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure; Fa. Sigma, München)**
- **HMFM (Hogness modified freezing medium):**
  - 3,6 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - 1,6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - 2 mM Natriumcitrat
  - 1 mM Magnesiumsulfat
  - 4% (v/v) Glycerin
- **Hypoxanthin (Fa. Sigma, München)**
- **IAC:**
  - 1 Teil Isoamylalkohol und 24 Teile Chloroform
- **Imidazol (Fa. Serva, Heidelberg)**
- **Immunpräzipitation**
  - Cellular Labeling and Immunoprecipitation Kit (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)
- **IPTG (Isopropylthio-β-D-Galaktosid; Fa. Gibco-BRL, Eggenstein)**
- **Isoamylakohol (Fa. Merck, Darmstadt)**
- **Isopropanol (2-Propanol; Fa. Roth, Karlsruhe)**
- **Kaliumacetat (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>KO; Fa. Roth, Karlsruhe)**
- **Kaliumchlorid (KCl; Fa. Merck, Darmstadt)**
- **Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; Fa. Merck, Darmstadt)**
- **Kaliumhydrogensphosphat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; Fa. Merck, Darmstadt)**
- **Kaliumphosphat (K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; Fa. Merck, Darmstadt)**
- **kB-Leiter ( 0,5- 10 kbp; Fa. Biolabs, New England)**
- **Klenow-Enzyme (Fa. Roche, Mannheim)**
- **Kodak GBX Entwickler (Fa. Sigma, München)**

- **Kodak GBX Fixierer** (Fa. Sigma, München)
- **Kristallviolett** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Kristallviolett-Färbelösung nach Witte:**
  - 15 g Kristallviolett
  - 85 ml Ethanol absolut (EthOH abs.)
  - 250 ml Formaldehyd mit A. dest. auf 1000 ml
- **Kawasaki Puffer:**
  - 20 mM Tris-HCl, pH 8,3
  - 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 25 mM KCl
  - 0,05 % Tween 20
  - mit A. dest. auf 50 ml
- **LB-Medium (Luria-Bertoni-Medium):**
  - 10 g/l Bacto Trypton (Fa. Difco, Detroit)
  - 5 g/l Bacto Yeast Extract (Fa. Difco, Detroit)
  - 5 g/l NaCl
  - auf pH 7,2 mit 1N NaOH eingestellt
- **LB-Amp-Nährbodenplatten:**
  - LB-Medium
  - 100 µg/ml Ampicillin
  - 1,5 % Bacto-Agar (Fa. Difco, Detroit)
- **LB-Amp-X-Gal-IPTG-Nährbodenplatten:**
  - LB-Amp-Medium
  - 80 µg/ml X-Gal
  - 240 µg/ml IPTG
  - 1,5 % Bacto-Agar
- **LB-Kana-Nährbodenplatten:**
  - LB-Medium
  - 50 µg/ml Kanamycin
  - 1,5 % Bacto-Agar

- **LB-Chloramphenicol-Nährbodenplatten:**
  - LB-Medium
  - 30 µg/ml Chloramphenicol
  - 1,5 % Bacto-Agar
- **Leupeptin** (Fa. AppliChem)
- **Lithiumchlorid** (LiCl; Fa. Merk, Darmstadt)
- **Lysis-Puffer B:**
  - 8 M Harnstoff
  - 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - 0,01 M Tris
  - in A. dest. mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt
- **Lysozym** (Fa. Serva, Heidelberg)
- **Magermilchpulver** (Fa. AppliChem )
- **Magnesiumacetat** (Mg<sub>3</sub>COO<sub>2</sub>; Fa. Sigma, München)
- **MgCl<sub>2</sub>** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Magnesiumsulfat** (MgSO<sub>4</sub>; Fa. Merck, Darmstadt)
- **Maleinsäure** (Fa. Sigma, München)
- **Maleinsäurepuffer (1x):**
  - 0,1 M Maleinsäure
  - 1,5 M NaCl
  - in A. dest. mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt
- **MEM** (Minimal Essential Medium; mit Hank's und Earle's-Salzen, Pyruvat und NaHCO<sub>3</sub>, Fa. Biochrom)
- **β-Mercaptoethanol** (Fa. Sigma, München)
- **Methanol, absolut** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Methylcellulose:**
  - 25g Methylcellulose, MC 4000 (Fa. Sigma, München)
  - in A. dest. ad 1000 ml
- **Molekulargewichtsmarker, vorgefärbt** (Fa. New England Biolabs)
- **Molekulargewichtsmarker, precision prestained Broad Range** (Fa. BioRad, München)
- **MOPS** (4-Morpholinpropansulfonsäure, 99,5 %; Fa. Sigma, München)

- **Mycophenolacid (MPA, Fa. AppliChem)**
- **N-Lauroylsarcosine (Fa. Sigma, München)**
- **Natriumacetat ( $C_2H_3NaO_2$ ; Fa. Roth, Karlsruhe)**
- **Natriumazid ( $NaN_3$ ; Fa. Sigma, München)**
- **Natriumziträt (Fa. Sigma, München)**
- **Natriumchlorid ( $NaCl$ ; Fa. Merck, Darmstadt)**
- **Natriumdesoxycholat (Fa. Merk, Darmstadt)**
- **Natriumdihydrogenphosphat ( $NaH_2PO_4$ ; Fa. Merck, Darmstadt)**
- **Natriumhydrogenphosphat ( $Na_2HPO_4$ ; Fa. Merck, Darmstadt)**
- **Natriumhydroxid ( $NaOH$ ; Fa. Merck, Darmstadt)**
- **Natriumphosphat ( $Na_3PO_4$ ; Fa. Merck, Darmstadt)**
- **N-Glykosidase F (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)**
- **Nickel-Lysis-Puffer:**
  - 8 M Harnstoff
  - 0,1 M  $NaH_2PO_4$
  - 0,01 M Tris
  - in A. dest. mit HCL auf pH 8,0 eingestellt
- **Nickel-NTA-Agarose (Fa. Qiagen, Hilden)**
- **NEA (Nicht essentielle Aminosäuren; Fa. Sigma, München)**
- **Nonident P-40 (NP-40; Fa. Sigma, München)**
- **PBS (Phosphate Buffered Saline; pH 7,4):**
  - 8 g  $NaCl$
  - 0,2 g  $KCl$
  - 1,12 g  $Na_2HPO_4$
  - 0,2 g  $KH_2PO_4$
  - 0,1 g  $CaCl_2$
  - 0,1 g  $MgCl_2 \times 6 H_2O$  ad 1000 ml A.dest
- **PBS ohne  $Ca^{2+}$  und  $Mg^{2+}$ :**
  - wie PBS, ohne  $CaCl_2$  und  $MgCl_2$
- **PerFectin® Transfektionsreagenz (Fa. Peqlab)**

- **Paraformaldehyd (PFA; Fa. Sigma, München)**  
1 % und 2 % (w/v) in 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- ***Pfu*-DNA-Polymerase (Fa. Stratagene)**
- **Phenol pH 8,0 (Fa. AppliChem, Darmstadt)**
- **PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid; Fa. AppliChem)**
- **Probenpuffer (4x) reduzierend:**  
4 ml SDS, 20 % (w/v)  
1 ml Glyzerin  
0,5 ml 1M Tris-HCl, pH 6,8  
0,1 ml Bromphenolblau 5 % (w/v)  
0,4 ml 2-Mercaptoethanol  
2,5 ml A. dest.
- **Probepuffer (4x) nicht reduzierend:**  
80 µl SDS 20 %  
1,6 ml Glyzerin  
2,0 ml Tris-SO<sub>4</sub>, 0,216 M, pH 6,1  
0,1 ml Bromphenolblau  
mit A. dest. auf 10 ml
- **Propidiumjodid (Fa. Sigma, München)**
- **Proteinasehemmer-Cocktail:**  
1 mM PMSF  
0,002 mg/ml Aprotinin  
0,002 mg/ml Leupeptin  
0,05 mg/ml TLCK,  
0,1 mg/ml TPCK,
- **Proteinase K (Fa. Sigma, München):**  
10 mg/ml in TE 10/1 pH 8,0
- **Qiagen Midi oder Maxi Kit (Fa. Qiagen, Hilden)**

- **Qiagen Puffer 1:**
  - 6,06 g Tris
  - 3,72 g EDTA
  - ad 1000 ml A. dest.
  - mit HCl auf pH 8,0 eingestellt
  - 100 mg/l RNase
- **Qiagen Puffer 2:**
  - 8,0 g NaOH
  - 50 ml 20% SDS
  - ad 1000 ml A. dest.
- **Qiagen Puffer 3:**
  - 294,5 g Natriumacetat
  - mit Eisessig auf pH 5, 5 eingestellt
  - ad 1000 ml A. dest.
- **QiaEx-Aufreinigungs-Kit (Fa. Qiagen, Hilden)**
- **ReddyMix<sup>TM</sup> PCR Master Mix (Fa. ABgene, Surrey, Großbritannien)**
- **Restriktionsendonucleasen (Fa. Roche, Mannheim; Fa. New England Biolabs, Fa. MBI)**
- **Rubidiumchlorid (RbCl<sub>2</sub>; Fa. Merk, Darmstadt)**
- **Ribonuklease A (Fa. AppliChem und VWR)**
- **Ripapuffer:**
  - 150 mM NaCl
  - 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
  - 0,1 % (w/v) SDS
  - 0,5 % (w/v) Natriumdesoxycholat
  - 1 % (v/v) NP-40
  - + Proteinasehemmer-Cocktail (siehe oben)
- **RNase A (Fa. Roche, Mannheim):**
  - 100 mg RnaseA in 1 ml TE-Puffer, pH 8,0



- Sarkosylpuffer:
  - 75 mM Tris-HCl, pH 8,0
  - 25 mM EDTA
  - 10 % (w/v) N-Lauroylsarkosin, Na-Salz
- SDS, Natrium-Dodecylsulfat (Fa. AppliChem):
  - 20 % (w/v) in A. dest.
- SOG-Medium:
  - 2 % Bacto Trypton (Fa. Difco, Detroit)
  - 0,5 % Bacto Yeast Extract (Fa. Difco, Detroit)
  - 10 mM NaCl
  - 2,5 mM KCl
  - 10 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 10 mM MgSO<sub>4</sub>
  - 2 % Glukose
- Southern-Blot-Blockierungspuffer:
  - 1x Maleinsäurepuffer
  - 1% (w/v) Blockierungsreagenz
- Southern-Blot-Detektionspuffer:
  - 100 mM Tris-HCl
  - 100 mM NaCl
  - auf pH 9,5 eingestellt
- Southern-Blot-Hybridisierungslösung:
  - 20 g Blocking Reagenz
  - 50 ml Formamid
  - 350 µl N-Laurylsarkosin, Na-Salz, 30% (w/v)
  - 100 µl SDS DNase-frei 20% (w/v)
  - 25 ml SSC (20x)
  - auf 1000 ml A. dest.
- Southern-Blot-Waschpuffer 1:
  - 2x SSC
  - 0,1% (w/v) SDS

- Southern-Blot-Waschpuffer 2:
  - 0,1x SSC
  - 0,1% (w/v) SDS
- Southern-Blot-Waschpuffer 3:
  - 1x Maleinsäurepuffer
  - 0,3 % (v/v) Tween20
- SSC (Standard Saline Citrate; 20x):
  - 3 M NaCl
  - 0,3 M Na-Citrat
- STET-Puffer:
  - 0,1 M NaCl
  - 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
  - 1 mM EDTA, pH 8,0
  - 0,5 % (v/v) Triton-X-100
- Sucrose (Fa. Merck, Darmstadt):
  - 30 % (w/v) in PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$
- STV, Saline-Trypsin-Versene-Lösung:
  - 100 ml Saline:
    - 240 g NaCl
    - 6 g KCl
    - 34,5 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
    - 6 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
    - 30 g Glucose
    - 300 ml Phenolrot, 0,1 % (auf 100 ml mit A. dest.)
    - ad 3000 ml A. dest.
  - 50 ml Trypsin: 1,25 % (w/v)
  - 25 ml Versene:
    - + 10 g/l EDTA
- Talon-NTA-Agarose (Fa. Qiagen, München)

- **TBS-T-Puffer:**
  - 150 mM NaCl
  - 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
  - 0,05 % (v/v) Tween-20
- **TEMED** (Tetramethylethyldiamin; Fa. Sigma, München)
- **TE-Puffer:**
  - 10 mM Tris, pH 8,0
  - 1 mM EDTA
- **TEN-Puffer:**
  - 150 mM NaCl
  - 20 mM Tris-HCl, pH 7,4
  - 1 mM EDTA
- **TFB-1-Puffer:**
  - 30 mM Kaliumacetat
  - 50 mM MnCl<sub>2</sub>
  - 100 mM RbCl<sub>2</sub>
  - 10 mM CaCl<sub>2</sub>
  - 15% (v/v) Glycerin
  - mit NaOH auf pH 5,8 eingestellt
- **TFB-2-Puffer:**
  - 10 mM MOPS, pH 7,0
  - 75 mM CaCl<sub>2</sub>
  - 10 mM RbCl<sub>2</sub>
  - 15 % (v/v) Glycerin
- **T4-DNA-Ligase mit 10x Ligasepuffer** (Fa. New England Biolabs, USA)
- **TLCK** (N-p-Tosyl-L Lysin Chloro-Methylketon, Fa. Sigma, München)
- **Towbin-Puffer pH 8,3 (Western-Blot):**
  - 25 mM Tris
  - 193 mM Glycin
  - 20 % (v/v) Methanol
  - in A. dest.
- **TPCK** (N-Tosyl-L Phenylalanin-Chloro-Methylketon; Fa. Sigma, München)
- **Tris** (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane; Fa. AppliChem, Darmstadt)

- Tris-Puffer pH 8,8 für das SDS-PAGE Trenngel:  
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
- Tris-Puffer pH 6,8 für das SDS-PAGE Sammelgel:  
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
- Triton-X-100 (Fa. Serva, Heidelberg)
- Tunicamycin (Fa. Roche, Mannheim)
- Tween20 (Polyoxyethylensorbitan; Fa. BioRad, München)
- Trypsin (Fa. Serva, Heidelberg)
- Xanthin (Fa. AppliChem)
- X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-b-D-Galactosid; Fa. Roche, Mannheim)
- Zitronensäure (Fa. Sigma, München)
- Zitrat-Puffer, pH 3,0:  
40 mM Zitronensäure  
10 mM KCl  
135 mM NaCl

### **3.1.6 Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien**

- Chromatographiepapier 3MM (Fa. Whatman)
- Eismaschine KF75 (Fa. Migel)
- Elektroelutionsgerät Centrilutor<sup>TM</sup> (Fa. Millipore)
- Elektrophoresekammer Mupid-2 (Fa. Cosmo Bio Co)
- Elektrophoresekammer 200 (Fa. Gibco BRL, Eggenstein)
- Elektrophoresekammer für PAGE-Gele: Mini-Protean II (Fa. BioRad, München)
- Elektrophoretische Transferkammer: Mini-Transblot II (Fa. BioRad, München)
- Elektroporationsapparat: Gene Pulser<sup>TM</sup> (Fa. Biorad, München)
- Elektroporationsküvetten: Elektrodenabstand: 2 mm (Fa. Biorad, München)
- Gelrockner Mididry (Fa. Biometra)
- Heizblock Thermostat 5320 (Fa. Eppendorf)
- Horizontal-Elektrophoresekammer (Fa. Gibco BRL, Eggenstein )

- Hyperfilm (Fa. Amersham)
- Kryoröhrchen CryoTube™, 2 ml (Fa. Nunc)
- Laborwaage, Präzisionswaage Navigator (Fa. Ohaus)
- Mikroskop für Fluoreszenz : Axiovert 25 (Fa. Zeiss)
- Mikroskop für Fluoreszenz Axioskop 2 plus (Fa. Zeiss)
- Nitrocellulose: Hybond C (Fa. Amersham)
- Nitrocellulose: Schleicher und Schuell (Fa. VWR)
- Nitrocellulose: Biometra
- Nylonmembran: Hybond N+ (Fa. Amersham)
- PCR-Thermocycler Gene Amp PCR System 2400 (Fa. Perkin Elmer, USA)
- pH-Meter (Fa. Beckman)
- Photometer: GeneQuant (Fa. Amersham)
- Photometer: Uvicon 860 (Fa. Kontron)
- Power-Supply Power Pac 300 (Fa. BioRad)
- Power-Supply Power Pac 200 (Fa. BioRad)
- Primer-Analysis Software OLIGO 4.1 (Fa. Biosciences, Annapolis)
- Roller-Schüttler SRT-1 (Fa. Stuart Scientific)
- Rührplattform IKA Combimag REO (Fa. IKA)
- Southern-Blot Transferapparatur Biometra Vacu-Blot (Fa. Whatman)
- Thermomixer compact (Fa. Eppendorf)
- Ultraschallwasserbad Transsonic T310 (Fa. Elma)
- UV-Transilluminator 302 nm (Fa. LTF)
- Vortex-Genie (Fa. Scientific Industries)
- Wasserbad: Julabo SW-20 C
- Zellkulturplastikwaren:
  - Zellkulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>, 25 cm<sup>2</sup>) (Fa. Nunc)
  - 6-, 24-, und 96-Lochplatten (Fa. Nunc und Fa. Sarstedt)
- Zellstoff (Fa. Hartmann)
- Zentrifugen:
  - Kühltentrifuge Heraeus Suprafuge 22 (Fa. Heraeus)
  - Rotor 12500 (Fa. Heraeus)
  - Rotor SS34 (Fa. DuPont Sorvall)

Kühlzentrifuge Sigma MK 202 (Fa. Sigma, München)

Kühlzentrifuge 1-15 K (Fa. Sigma, München)

Kühlzentrifuge 4 K 10 (Fa. Sigma, München)

Stock-Zentrifuge (Fa. Wilhelm Stock)

Ultrazentrifuge LE 80 K (Fa. Beckman)

Rotor SW 28

Rotor SW 40 (beide Fa. Beckman)

Tischultrazentrifuge TL 100 (Fa. Beckman)

Rotor TLA 100

Rotor TLA 45

Vakuumtrockenzentrifuge Speedvac SV DNS 110 (Fa. Savant)

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellen**

#### **3.2.1.1 Zellkultur**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Vero-, Edmin337- und RK13-Zelllinien verwendet. Die Zellen wurden in Hank's Modified Eagle's Medium mit 6 % FKS (30 min bei 56 °C inaktiviert) kultiviert. Zur kontinuierlichen Kultivierung wurden die Zellen, je nach Wachstumsgeschwindigkeit, alle 2-4 Tage zwischen 1:3 und 1:10 verdünnt. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und der Zellrasen einmal mit PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  gewaschen, um die im Serum enthaltenen Proteaseinhibitoren zu entfernen. Die Zellen wurden dann durch Zugabe einer trypsinhaltigen Lösung (STV) von der Kulturflasche abgelöst. Je nach gewünschter Verdünnung wurden die Zellen in Medium resuspendiert und in Kulturflaschen oder Platten ausgesät. Die Zellen wurden in einer feuchten Atmosphäre mit 5 %  $\text{CO}_2$ -Gehalt bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

#### **3.2.1.2 Kryokonservierung von Zellen**

Zur langfristigen Konservierung wurde eine kleine Flasche mit konfluenten, ( $1 \times 10^6$ ) am Vortag frisch geteilten Zellen mit STV abgelöst und bei 1000 U/min 10 min abzentrifugiert (Stock-Zentrifuge). Das Zellpellet wurde in 1,5 ml Medium mit 15 % FKS und 10 % DMSO aufgenommen und in Kryoröhrchen abgefüllt. Die Röhrchen wurden 4 Stunden bei 4 °C inkubiert, danach bei -80 °C tiefgefroren und zur langfristigen Aufbewahrung bei -120 °C gelagert.

#### **3.2.1.3 Herstellung von Zelllysaten**

Um virale Proteine zu charakterisieren, wurden Zellen mit einer MOI von 2 infiziert und nach definierten Zeitpunkten geerntet. Sämtliche Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Der Zellrasen wurde einmal mit eiskaltem PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  gewaschen, um Reste von Medium und FKS zu entfernen, anschließend mit einem Zellschaber vom Flaschenboden abgekratzt und in kaltes PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  aufgenommen. Nach Zentrifugation (10 min

bei 1000 U/min) wurde der Überstand vorsichtig entfernt und das Zellpellet in Ripa-Puffer (200 µl Ripa-Puffer pro  $5 \times 10^5$ ) aufgenommen. Das Zelllysate wurde portioniert und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Der Proteingehalt der Zelllysate wurde mit dem BCA-Kit® (nach Anleitung des Herstellers) bestimmt und eingestellt.

### **3.2.2 Virus**

#### **3.2.2.1 Verwendete Virusisolate**

##### **EHV-4**

Die beschriebenen Experimente wurden mit einem in den USA aus einem Pferd mit respiratorischen Symptomen isoliertem EHV-4-Stamm (MSV Lot 071389) durchgeführt. Das Virusisolat wurde auf Vero-Zellen vermehrt.

##### **EHV-1**

Es wurde das Plaqueisolat vom EHV-1-Stamm RacL11 aus der 12. Passage von RacH verwendet, das auf embryonalen Schweinenierenzellen (ENS) attenuiert wurde ist. Dieses Isolat ist sowohl für den natürlichen Wirt, als auch für Labortiere virulent.

#### **3.2.2.2 Virusvermehrung in Zellkultur**

Konfluent gewachsene Zellen wurden einmal mit PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  gewaschen, bevor eine Virussuspension in frischem Medium ohne FKS verimpft wurde. 1 h p.i. (post infectionem) wurde den Zellen frisches Medium mit 2 % FKS zugesetzt. Die Zellen wurden mit einer MOI (multiplicity of infection) von 0,1 infiziert und bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zum Erreichen eines zytopathischen Effekts (zpE) von 80 % -100 % inkubiert. Die Zellkulturflaschen wurden zweimal bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren und wieder aufgetaut, um auch intrazellulär gelegene Virionen freizusetzen. Die Virus-Zell-Suspension wurde portioniert und bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.



### 3.2.2.3 Virustitration

Um die Zahl der infektiösen Viren, in Plaque-bildenden-Einheiten pro ml Virussuspension (pbE/ml) zu ermitteln, wurde der Virus-Stock titriert. Dazu wurde eine 10er logarithmische Verdünnungsreihe von  $10^{-1}$  bis  $10^{-7}$  in Medium angelegt und je 1 ml im Doppelansatz auf konfluente Zellen in 24-Loch-Platten pipettiert. Die Zellen wurden 90 min bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Brutschrank inkubiert, danach wurde die Virussuspension durch Methylcellulose ersetzt. Die Methylcellulose verhindert die Ausbreitung der Nachkommen-Viren über das Medium. Nach Erscheinen von Plaques 2-4 Tage p.i. wurde die Zahl der Plaques pro Verdünnungsstufe unter dem Mikroskop ausgezählt und der Titer des Virus-Stocks ermittelt.

### 3.2.2.4 Präparation viraler DNA

Für die Aufreinigung viraler DNA wurden Vero-Zellen mit einer MOI von 0,1 infiziert und bis zu einem zpE von 100 % bei 37 °C inkubiert. Die Zellkulturflaschen wurden dreimal gefriergetaut (-70 °C / Raumtemperatur). Die gewonnene Virus-Zellsuspension wurde 3 h bei 28000 U/min (SW-28-Rotor, Fa. Beckmann) pellettiert. Das Pellet wurde in 900 µl TEN-Puffer aufgenommen und nach Zugabe von 450 µl Sarkosyl-Puffer 15 min bei 65 °C inkubiert. Nach Zusatz von 3 µl RNase A (100 mg/ml) wurde die Lösung 30 min bei 37 °C inkubiert. RNase-A zerstört sowohl virale als auch zelluläre RNA. Um zelluläre und virale Proteine zu zerstören, wurde 100 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugefügt und bis zum Entstehen einer klaren Lösung bei 56 °C inkubiert. Durch Phenolextraktion wurden Proteine und Lipide entfernt. Dazu wurde der Reaktionsansatz zweimal mit der gleichen Menge an Phenol unter Schwenken vermischt. Der Ansatz wurde 20 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 8000 U/min (Sigma Tischzentrifuge Mk 202) zur Phasentrennung zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde mit abgeschnittenen Spitzen, um die DNA nicht zu scheren, vorsichtig in ein neues Eppendorf-Gefäß pipettiert. Durch zweimaliges Ausschütteln mit IAC im Verhältnis 1:1 wurde restliches Phenol entfernt. Die virale DNA wurde mit doppeltem Volumen eiskaltem absolutem Ethanol und mit 1/10 des Volumens 4 M LiCl ausgefällt (20 min bei -70 °C). Nach Zentrifugation (30 min bei 13000 U/min, Sigma Mk 202) wurde das Pellet zweimal mit 70 % eiskaltem Ethanol gewaschen. Die luftgetrocknete Virus-DNA wurde anschließend in A. dest. aufgenommen, die Konzentration im Photometer bestimmt und portioniert bei -20 °C gelagert.

### **3.2.2.5 Reinigung extrazellulärer Virionen**

Konfluente Zellen wurden mit einem MOI von 2 infiziert. 16 h p.i. wurde der Überstand abgenommen und durch Zentrifugation (10 min 2000 U/min) von den zellulären Bestandteilen gereinigt (Stock Zentrifuge). Je 28 ml Überstand wurden mit 8 ml 30 % Sucrose unterschichtet. Die Virionen wurden durch dreistündige Zentrifugation (28000 U/min, bei 4 °C, Rotor SW 28, Fa. Beckmann) pellettiert. Das Pellet wurde in 0,5 ml Hank's Medium mit 5 % FKS aufgenommen. Danach wurde die Suspension 10 min mit Ultraschall behandelt. Um mögliche Verunreinigungen zu entfernen, wurden die Virionen erneut durch 1 ml 30 %ige Sucrose zentrifugiert (28000 U/min, 90 min, Tischzentrifuge, Rotor TLA 45). Das Pellet wurde, um Sucrose-Reste zu entfernen, in 1 ml PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  resuspendiert, nochmal 10 min mit Ultraschall behandelt und erneut zentrifugiert (28000 U/min, 90 min, Tischzentrifuge, Rotor TLA 45). Das Pellet wurde bei -20 °C gelagert und zur Verwendung in PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  aufgenommen.

### **3.2.2.6 Trennung gereinigter Virionen in Hülle und Kapsid**

Um die Lokalisation eines Proteins innerhalb der Virionen zu bestimmen, wurden diese in eine Membran- und eine Nukleokapsid-Fraktion getrennt. Dazu wurden die aufgereinigten extrazellulären Virionen (siehe 3.2.2.5) mit der gleichen Menge einer 2 % Triton X-100-Lösung (in PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) resuspendiert und 20 min bei 45 °C inkubiert. Nach einer 15-minütigen Behandlung mit Ultraschall und anschließenden Zentrifugation (Tischultrazentrifuge, 30 min bei 32000 U/min) wurde der membranhaltige Überstand vorsichtig entnommen und bei -20 °C gelagert. Um mögliche Reste der Membran-Fraktion zu entfernen, wurde das aus Nukleokapsiden bestehende Pellet in 1 ml PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  sorgfältig resuspendiert, für 30 min mit Ultraschall behandelt und erneut zentrifugiert (Tischultrazentrifuge, 90 min 28000 U/min). Dieser Schritt wurde 2-mal wiederholt, danach wurde das Pellet bei -20 °C gelagert.

### **3.2.2.7 Hemmung der DNA-Synthese in virusinfizierten Zellen mit Phosphonoessigsäure (PAA)**

Um die Expression viraler Proteine in Abhängigkeit von der Virus-DNA-Replikation zu untersuchen, wurde der DNA-Synthese-Inhibitor Phosphonoessigsäure (Phosphono acetic acid, PAA) verwendet. Dazu wurde so vorgegangen, wie in 3.2.11.3 beschrieben, jedoch wurden zu den infizierten Zellen 0,1, 0,5, und 1 mg PAA / ml Medium zugesetzt. Nach einer Inkubation von 16 h wurde wie unter 3.2.1.3 beschrieben weiterverfahren.

### **3.2.3 Expression viraler Gene in eukaryotischen Zellen**

Unter bestimmten Bedingungen können eukaryotische Zellen fremde DNA aufnehmen (Graham und van der Eb, 1973) und nach Transfektion heterologer DNA ein exogenes Protein synthetisieren. Das fremde Protein kann entweder begrenzt (transient) oder dauerhaft (stabil) exprimiert werden.

#### **3.2.3.1 Transfektion mit PerFectin™**

Perfectin™ bewirkt eine Umhüllung der zu transfizierenden DNA mit Phospholipiden. Die DNA haftet zunächst an der Zellmembran und verschmilzt dann mit dieser. Die am Vortag geteilten Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 70 % mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert. Bei der Verwendung des Transfektionsreagenz PerFectin™ (Fa. Peqlab) wurde nach Anweisung des Herstellers vorgegangen. Nach Inkubation über Nacht unter Standardbedingungen wurde das Transfektionsmedium gegen FKS-enhaltendes Medium ausgetauscht.

#### **3.2.3.2 Herstellung rekombinanter Zelllinien**

Bei der stabilen Expression von heterologen Genen wird die DNA ins Zellgenom eingebaut. Da die Integration eines fremden Gens ein sehr seltenes Ereignis ist, ist eine Selektion auf stabil transfizierte Zellen notwendig. Zur Selektion wurde entweder das Plasmid pSV2-neo mit dem Expressions-Plasmid in Verdünnung 1:10 verdünnt transfiziert oder ein Plasmid

(Kap. 4.1) das gewünschte Gen und das Resistenzgen gegen das Aminoglykosidantibiotikum Genetizin (G-418) trägt, verwendet. Die transfizierten Zellen wurden 48 h nach Transfektion in ein Gemisch aus 40 % zwei Tage altem Zellkulturüberstand, (die möglichen vorhandene Zellen im Überstand wurden durch Zentrifugation 2000 U/min / 10 min entfernt) 50 % frischem Medium, 10 % FKS und 600 µg/ml G-418 titriert. Um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten wurde dieses Medium alle zwei Tage erneuert. Nachdem sich aus resistenten Einzelzellen Kolonien gebildet hatten, wurden diese mit STV abgelöst und auf 96-Loch-Platten ausgesät. Die Zellklone wurde mittels Western Blott und Immunfluoreszenz auf die Expression des Fremdgens überprüft. Die etablierte Zelllinie wurde wie die Ausgangszellen kultiviert, jedoch um die Aufrechterhaltung der Fremdgenexpression zu gewährleisten, dem Zellkulturmedium jede 5. Passage 600 µg/ml G-418 zugesetzt.

### 3.2.4 Herstellung rekombinanter Viren

Durch die Herstellung einer Virusmutante kann die Funktion eines Genprodukts innerhalb des viralen Vermehrungszyklus untersucht werden. Dabei werden nach dem Prinzip der homologen Rekombination die Zielsequenzen durch heterologe Sequenzen, die von homologen Bereichen flankiert sind, ersetzt. Durch die Klonierung eines gesamter viraler Genome als infektiöse "*bacterial artificial chromosomes*" (BACs) wurde die Herstellung von Virusmutanten durch Nutzung des bakteriellen Rekombinationsapparats unabhängig von eukaryotischen Zellen möglich gemacht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Deletionmutante mittels dieser Strategie hergestellt. Dabei wurde die homologe Rekombination zwischen einem lineare DNA-Fragment und dem zirkulären EHV-1-BAC-Genom, pRacL11, durch das Plasmid-pGETrec im *E.-coli*-Stamm-DH10B vermittelt. Das Plasmid pGETrec kodiert für RecE, eine Exonuklease, für RecT, ein einzelsträngiges-DNA-bindendes-Protein und für das  $\gamma$ -Genes, dessen Produkt das lineare DNA-Fragment gegen eine Degradierung durch Nuklease schützt. Der *E.-coli*-Stamm-DH10B ist besonders geeignet für die BAC-Mutagenese, da ihm die Gene, *recA* und *recBCD*, fehlen. Durch die Inaktivierung des *recA*-Gens können die für die homologe Rekombination nötigen homologen Regionen auf ein Minimum reduziert werden (von 1000 bp auf 100 bp). Durch Deletion des *recBCD*-Komplexes, einer weiteren Exonuklease, wird das lineare DNA-Fragment vor Degradierung geschützt.

Als lineares DNA-Fragment wurde das Kanamycin-Resistenzgen aus dem Plasmid pACYC177 (Fa. Biolabs) durch eine Standard-PCR amplifiziert (s. 3.2.7.1). Die Primer (gh1dellow und gh1delforw) wurden so ausgewählt, dass an das amplifizierte DNA-Fragment das gH-Gen flankierende homologe EHV-1-Bereiche wurde (Tab. 1). Nach der Amplifizierung wurde das PCR-Produkt, wie unter 3.2.7.2 beschrieben, aufgereinigt und anschließend mit der doppelten Menge 100%igem Ethanol und 10 % Natriumacetat 20 min bei -80 °C gefällt. Die DNA wurde nach Zentrifugation (mindestens 25 min 13000 U/min) zweimal mit je 300 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die DNA in A. dest. aufgenommen.

Elektrokompetente Bakterien (3.2.7.6.1) wurden mit 10-100 ng DNA des aufgereinigten Amplifikat transformiert (3.2.7.6.2). Die Selektion auf rekombinante DNA-beherbergenden Bakterien-Kolonien erfolgt über die Kanamycin-Resistenzgen. Aus diesen Kolonien wurde die extrachromosomale DNA isoliert (3.2.7.7.2) und durch Restriktionsverdau und nachfolgenden Southern Blot (3.2.6.3) auf ihr Genotyp überprüft.

### **3.2.5 DNA-Analyse**

#### **3.2.5.1 DNA-Konzentrationsbestimmung**

Um die Konzentration der isolierten DNA zu bestimmen, wurde entweder die Absorption bei 260 nm (GeneQuant Photometer, Fa. Amersham) bzw. die Extinktion (Uvicon 860, Fa. Kontron) der in A. dest. gelösten DNA bestimmt. Aus der optischen Dichte (OD) bei 260 nm bis 280 nm lässt sich die Konzentration von DNA photometrisch bestimmen. Die  $OD_{260}$  entspricht 50 µg/ml genomischer DNA (Sambrook *et al.*, 1989). Der Quotient  $OD_{260} / OD_{280}$  ergibt 1,8 bis 2,0 wenn die DNA sehr rein ist (Sambrook *et al.*, 1989).

#### **3.2.5.2 Charakterisierung von DNA durch Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen**

Zur enzymatischen Spaltung von aufgereinigter Plasmid oder viraler DNA wurde 0,5-1 µg der DNA in einem Ansatz mit 1 x Puffer und 5 bis 10 Units Enzym in A. dest. 1–2 h (Plasmid-DNA) bzw. 3–5 h (virale DNA) bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde zum Teil durch Erhitzen (20 min, 65 °C) bzw. durch Zugabe von 1/10 des Volumens BSE-Puffer gestoppt. Je nach Größe der Fragmente erfolgte die Auftrennung in 0,6-2%igen Agarosegelen

bei einer Gleichspannung von 20 Volt (viraler DNA) bis 100 Volt (Plasmid). Das Gel wurde 10 min in Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und zur Dokumentation unter UV-Licht (302 nm) fotografiert. Die Größe und Menge der aufgetrennten DNA wurde anhand von miteingesetzten standardisierten Größenmarkern (KB-Leiter) ermittelt.

### **3.2.5.3 DNA-Charakterisierung durch DNA-DNA Hybridisierung (Southern Blot)**

Zur Charakterisierung rekombinanter Viren wurde virale DNA mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten und spezifische DNA-Fragmente durch Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten DNA-Sonden detektiert.

#### Markierung von DNA mit Digoxigenin

Zur Markierung bestimmter DNA-Fragmente wurde ein kommerzielles Kit (DIG-High-Prime™ Kit, Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Diese Methode basiert auf der “random primed labelling” Methode (Feinberg und Vogelstein, 1983). Dabei wird die denaturierte, zu markierende DNA mit einem Hexanukleotid-Mix aller Basensequenzkombinationen hybridisiert. Der komplementäre DNA-Strang wird durch das Klenow-Enzym komplementiert, das die 3'-OH Ende der “random” Oligonukleotide als Primer benutzt. Zur Elongation wird ein Gemisch von Desoxyribonukleotiden, die auch DIG-11-dUTP (alkal-labil) enthalten, benutzt. DIG-UTP wird als 20-25 Nukleotide in die neu-synthetisierte DNA eingebaut. Diese Hapten-Dichte in der DNA ergibt die höchste Sensitivität in der Nachweisreaktion. Die hergestellte DNA-Sonde wurde vor der Hybridisierung durch Erhitzen auf 100 °C für 10 min und sofortiges Abkühlen auf Eis denaturiert, mit 15 ml vorgewärmter (68 °C) Hybridisierungslösung vermischt und bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

#### Southern-Blot

Nach Restriktionsendonukleasespaltung wurden die entstandenen Fragmente der viralen DNA bzw. des viralen BAC mittels Gelelektrophorese (0,8 %iges Gel) bei einer Spannung von 20 Volt aufgetrennt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht fotografiert. Um den Transfer hochmolekularer Fragmente auf die Nylonmembran zu erleichtern, wurde das Gel nach 5-minütiger Bestrahlung mit UV-Licht in 0,4 M NaOH 1 h

bei 150 mbar auf eine Nylonmembran (Fa. Biometra) überführt. Anschließend wurde die Membran zur Immobilisierung der DNA 2 h bei 80 °C gebacken.

### DNA-DNA-Hybridisierung

Zur Vorhybridisierung wurden die Filter mit 10 ml Prähybridisierungslösung/100 cm<sup>2</sup> Membranfläche in Polyethylenfolien eingeschweißt und im Schüttelwasserbad bei 42 °C inkubiert. Nach 1–3 h wurde der Prähybridisierungspuffer entfernt und die Membran in gleicher Weise über Nacht mit der zuvor erhitzten, 10 min auf 68 °C, DIG-markierten DNA-Sonde hybridisiert.

### Immunodetektion

Zum immunologischen Nachweis der hybridisierten Sonden wurde ein Konjugat aus polyklonalen mit alkalischer Phosphatase gekoppelten anti-Digoxigenin-Antikörpern eingesetzt. Nach Bindung des Antikörperkonjugates an die hybridisierte Sonde erfolgte der Nachweis nach Zugabe von Chemilumineszenz-Substraten der alkalischen Phosphatase und Detektion der Signale auf Röntgenfilmen.

Überschüssige DNA-Sonden, die nicht durch Hybridisierung an die Membran gebunden waren, wurden zunächst 2 x 5 min bei Raumtemperatur (RT) mit Waschpuffer-1 und anschließend 2 x 15 min bei 68 °C mit Waschpuffer-2 abgewaschen. Die weiteren Arbeitsschritte bis zur Zugabe der Chemilumineszenz-Substrate der alkalischen Phosphatase wurden unter leichtem Schütteln bei RT durchgeführt. Die Membran wurde nach kurzem äquilibrieren in Waschpuffer-3, 1 Stunde in 100 ml / 100 cm<sup>2</sup> Blockierungslösung, anschließend 1 Stunde in Antikörperlösung (Verdünnung 1:5000 in Blockierungslösung) inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden in zwei Waschschritten von je 15 min in 100 ml / 100 cm<sup>2</sup> Waschpuffer-3 entfernt. Die Membran wurde kurz in Detektionspuffer äquilibriert und anschließend bei RT in 3 ml/100 cm<sup>2</sup> CSPD<sup>®</sup>-Lösung in Folien eingeschweißt und 5 min bei RT inkubiert. Die überschüssige Substratlösung wurde durch Überstreichen mit einem Tuch entfernt, die noch feuchte Membran in Kunststoff-Folie eingeschweißt und 5-15 min bei 37 °C inkubiert. Die Detektion erfolgte durch Auflegen eines Röntgenfilms 5-30 min.

### 3.2.6 Klonierung viraler DNA

#### 3.2.6.1 Amplifizierung von DNA-Abschnitten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) wird die spezifische Amplifikation von DNA-Segmenten ermöglicht, die von spezifischen Oligonukleotidprimern flankiert werden (Saiki *et al.*, 1985). Diese Methode besteht aus drei charakteristischen Phasen: Denaturierung, Primer-Bindung (Annealing) und DNA-Polymerisation (Elongation). Die automatisierte Wiederholung dieser Schritte in Kombination mit hitzestabiler *Pfu*-Polymerase (Saiki *et al.*, 1988) ermöglicht die Polymerasekettenreaktion. Ein entscheidender Faktor für Erfolg und Spezifität einer PCR sind die Sequenzen der eingesetzten Oligonukleotide (Primer). Zur Auswahl geeigneter Sequenzen für die Herstellung von Primer dienten die veröffentlichten Sequenzen von EHV-1/EHV-4 (Telford *et al.*, 1998). Die Primer wurden so gewählt, dass sie komplementär zu je einem Strang der Matrize und nicht selbstkomplementär oder kombiniert zueinander komplementär sind. Die lyophilisierten Primer (Fa. MWG Biotech, Ebersberg) wurden in A. dest. resuspendiert, auf eine Konzentration von 0,2 µg/µl eingestellt und bei -20 °C gelagert. Für die PCR-Reaktionen wurden das “Thermocycler Gene Amp PCR-System” (Fa. Perkin Elmer) verwendet. Die verwendeten Primersequenzen in 5′–3′ Richtung sind in Tabelle 1 aufgeführt.



**Tabelle 1:** Verwendete Primersequenzen. Restriktionsendonuklease-Erkennungssequenzen sind unterschrieben. Kanamycin-spezifische Sequenzen sind hervorgehoben.

Primer	Sequenz 5'----->3'	Schmelztemperatur $T_m$
gH4.low	ATG <u>CTC GAG</u> CTC AGA GTT TAA TAA CAA	60,4 °C
gH4.up	ATA <u>GGA TCC</u> ATG TCA CAA CCG TAT CTA	61,9 °C
Del1hlow	ATT <u>GGT ACC</u> CTT TAA TTA ACA TAA TCG CAG CAG TAT TTA	65,2 °C
Del1hup	<u>ATG AAT TCA</u> CAA GCT TAG TGG GGT CTG	63,4 °C
Del2hlow	ATA <u>CTG CAG</u> GGT CGA TGA AAT TAT CTT GG	63,9 °C
Del2hup	ATA <u>GGA TCC</u> CTT TAA TTA ATA TGT GGT GGT GTA ATT	63,8 °C
gH4inslow	TTC GCA CCA ATT GCT AAT	49,1 °C
gH4insup	GGC CGA GAT ACT CGA GGT	58,2 °C
gh1dellow	AGC ACA TAC ATA CCA CAG TCG CAC AAA TAT TGT CTA ACA TGG GGG GTA ACA ACA CAC GGG ATA TTT GTT TAG CCA GTG TTA CAA <b>CCA ATT</b> <b>AAC</b>	> 75 °C
gh1delforw	ACA GTG CGG CCG AGC CAC TCA AGA TAT ACC GTG GCT GTA CAT TAA CTT GGG AAT CAT TAC TTC CGC GAT CCG ATT TAT TCA ACA <b>AAG CCA</b> <b>CG</b>	> 75 °C

In 0,2 ml Reaktionsgefäßen wurden folgende Komponenten auf Eis gemischt:

73 µl H<sub>2</sub>O bidest., steril

10 µl *Pfu*-Reaktionspuffer (Promega)

5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub> (MBI Fermentas)

5 µl DMSO

2 µl dNTP-Mischung

1 µl Primer low

1 µl Primer up

2 µl DNA als Template

Nach einer ersten Denaturierungsphase von 5 bei 96 °C erfolgte die Zugabe von *Pfu*-Polymerase. Anschließend folgten 30–45 Zyklen (je nach PCR) mit je 45-sekündigen Denaturierung bei 94 °C, 45-sekündigen Annealingphase bei 50 °C und 5-minütigen Synthesephase bei 72 °C.

### **3.2.6.2 Aufreinigung und Präparation von DNA nach Restriktionsenzymverdau der PCR-Amplifikate**

Für die Reinigung von DNA-Fragmenten nach Verdau mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen bzw. PCR-Amplifikaten aus Agarosegelen wurde ein DNA-Purification-Kit (Fa. Amersham) verwendet. Nach Restriktionsenzymverdau wurden die DNA-Fragmente durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und anschließend die gewünschten Banden mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die DNA wurde nach Angabe des Herstellers aus dem Agarosegel extrahiert. Die gewonnene DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C gelagert.

### **3.2.6.3 Modifikationen an den freien Enden der DNA-Fragmenten**

#### Dephosphorylierung von 5' – Phosphatgruppen

Bei der Ligation wird ein 5'-Phosphat- mit einem 3'-OH-Ende kovalent verknüpft. Um zu verhindern, dass ein linearisiertes Plasmid wieder mit sich selbst ligiert, wurden die geschnittenen Vektoren mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) behandelt. Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse endständiger 5'-Phosphatgruppen von linearen DNA-Molekülen. Zu einer Ligationsreaktion kommt es im Anschluss nur noch dann, wenn DNA-Fragmente mit intakten 5'-Phosphatgruppen zu dem dephosphorylierten, linearisierten Plasmid gegeben werden. Dazu wurde das zu dephosphorylierende, linearisierte Plasmid mit 10 U einer CIP (Fa. Biolabs) 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,1 M EDTA, pH 8,0, und 1 h bei 65 °C gestoppt.

### Klenow Behandlung (fill-in)

Für einige Klonierungen war es notwendig, die überstehenden Enden (sticky ends) nach dem Restriktionsverdau zu modifizieren, um glatte Enden (blunt ends) zu erzeugen. Das Klenow-Fragment, das N-terminale Fragment der *E. coli* DNA-Polimerase I, besitzt zwei Enzymfunktionen, nämlich die Polymerase-Funktion, bei der Oligonukleotide verknüpft werden, und eine 3'-5'-Exonuklease-Funktion, bei der die überhängenden 3'-DNA-Enden entfernt werden. Diese Methode der Modifikation an den freien Enden der DNA wird als "Blunten" bezeichnet. Um "blunt ends" zu erzeugen, wurde 1 µg gespaltene DNA mit 1 U Klenow-Enzym nach Zugabe von 1 µl dNTPs (25 mM) in 1x mitgeliefertem Puffer für 15 min bei 25 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen (10 min, 75 °C) gestoppt.

#### **3.2.6.4 Ligation von DNA-Fragmenten**

Die T4-DNA-Ligase ist für die Ligation von DNA-Fragmenten besonders geeignet, da sowohl komplementäre "sticky ends" als auch "blunt ends" ligiert werden können. Bei der Ligation eines linearen Vektors mit einer linearen Insert-DNA werden unter ATP-Verbrauch die komplementären 5'-Phosphat- und die 3'-OH-Enden verbunden.

Die zu ligierenden DNA-Fragmente (molares Verhältnis von 1:3, Vektor : Insert) wurden mit 10.000 U T4-DNA-Ligase (Fa. New England Biolabs) pro µg DNA im gelieferten Puffer über Nacht bei 16 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen (65 °C, 10 min) gestoppt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### **3.2.6.5 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA**

##### **3.2.6.5.1 Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation mittels Hitzeschock**

Um DNA in *E. coli*-Zellen einzubringen, muss die Zellmembran für Makromoleküle permeabel gemacht werden. Dazu werden die Zellen mit Rubidiumchlorid (RbCl), Manganchlorid (MnCl) und Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>) behandelt. *E. coli* DH5α-F', TOP-10, BL21 und M15 wurden nach der Methode von Hanahan vorbereitet (Hanahan und Meselson, 1983; Sambrook *et al.*, 1989). Eine übernachtkultur wurde in LB-Medium mit einer frisch

angezogenen Kolonie angesetzt. 100 ml LB-Medium wurde mit 1 ml der Übernachtskultur beimpft. Als die Kultur sich in der log-Phase des Wachstums befand und eine Keimdichte von ca.  $5 \times 10^8$  (O.D.<sub>600</sub> ca. 0,5) erreichte, wurden die Zellen 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend 10 min bei 3000 U/min (Heraeus Suprafuge, Rotor 12500) und 4 °C pelletiert. Nach Dekantieren des Mediums wurde das Pellet in 30 ml eiskaltem TFB-1-Puffer resuspendiert und nach 10-minütiger Inkubation auf Eis erneut abzentrifugiert (s.o.). Das entstandene Pellet wurde in 4 ml TFB-2-Puffer aufgenommen, portioniert (à 60 µl) und sofort bei – 70 °C eingefroren.

### 3.2.6.5.2 Transformation mittels Hitzeschock

Bei der Transformation werden DNA-Plasmide in kompetente Zellen eingeführt. Die Zellwände der kompetenten Bakterien sind für DNA durchlässig. Die wegen ihrer Phosphatgruppen negativ geladene DNA bindet an die entsprechend vorbehandelten Bakterienzellwände an und wird dann während des Hitzeschocks (2 min 42 °C) ins Cytosol aufgenommen.

Das Aliquot (60 µl) von kompetenten *E. coli* wurde auf Eis aufgetaut und mit 10–20 µl des Ligationsansatzes vorsichtig vermischt. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurde die DNA durch einen 2-minütigen Hitzeschock bei 42 °C und sofortigem Abkühlen auf Eis in die Bakterien eingeschleust. Um die Expression des vektorkodierten Antibiotika-Resistenzgens zu ermöglichen, wurde der Bakteriensuspension 198 µl warmes SOB (37 °C) und 2 µl 40 %ige Glukose zugegeben, für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und anschließend auf LB-Platten mit Antibiotikazusätzen (je nach verwendetem Vektor: Ampicillin, Kanamycin oder Chloramphenicol, IPTG und X-Gal) ausgestrichen. Nur die Zellen, die Plasmid-DNA aufgenommen hatten, trugen die Resistenz gegen die in den Agarplatten enthaltenen Antibiotika und wuchsen über Nacht im Brutschrank bei 37 °C zu einer Einzelkolonie heran. LB-Platten mit Ampicillin, IPTG und X-Gal als Zusätze wurden dann verwendet, wenn die Klonierung in den Vektor pTZ18R durchgeführt worden war. Dieser Vektor enthält das β-Galaktosidase kodierende Gen, das dafür verantwortlich ist, dass das Substrat X-Gal in eine blaue Substanz umgesetzt wird. Durch Insertion von DNA in die “multiple cloning site” des Vektors wird die Genkassette unterbrochen, so dass die Bakterien nicht mehr fähig sind, das X-Gal umzusetzen. Die über Nacht gewachsenen Kolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und über Nacht bei 37 °C in 3 ml LB-Antibiotikum-Medium geschüttelt.

### **3.2.6.6 Transformation von Bakterien mit BAC-DNA durch Elektroporation**

#### **3.2.6.6.1 Herstellung elektrokompenter Bakterien**

Bakterien (DH10B), die für die Elektro-Transformation benötigt wurden, wurden zuvor nach Vorschrift der Firma Bio-Rad (high efficiency electro-transformation of *E. coli*) vorbereitet. 100 ml LB-Medium wurden mit 2 ml einer frischen Übernachtskultur angeimpft und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 unter kräftigem Schütteln inkubiert. Nach 15-minütiger Abkühlung auf Eis wurden die Bakterien abzentrifugiert (10 min, 3500 U/min, 4 °C Sigma Heraeus 22, Rotor 12500), das Pellet wurde in 100 ml eiskaltem A. dest. aufgenommen und abzentrifugiert. Damit wurde für die Entfernung von Elektrolyten gesorgt, die bei der Elektroporation stören würden. Die Zellen wurden zweimal mit je 50 ml 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert und abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 500 µl 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert und in 50 µl Portionen bei -70 °C eingefroren. Diese Schritte dienen der vollständigen Entfernung von Salzen, das Glycerin schützt die Zellen beim Einfrieren vor der Zerstörung durch Eiskristalle.

#### **3.2.6.6.2 Transformation durch Elektroporation**

Die Elektroporation ist eine effiziente Methode zum Transfer von DNA in Bakterienzellen. Die Methode beruht auf der Beobachtung, dass kurze Hochspannungspulse Löcher in der Zellhülle verursachen, durch welche dann DNA in die Zelle aufgenommen werden kann. Für die Elektroporation wurden 10-100 ng DNA eingesetzt. Die Elektroporationsküvetten wurden auf Eis vorgekühlt und die elektrokompenten Bakterien auf Eis aufgetaut. Die Zellsuspension wurde anschließend in die Elektroporationsküvetten pipettiert (zwischen die Elektroden). Die Zellen wurden mit einer Spannung von 2,5 kV elektroporiert. Der Widerstand betrug 200  $\sigma$  und die Kapazität C des Kondensators 25  $\mu$ F. Nach der Elektroporation wurden die Zellen sofort in 800 µl 37 °C warmen SOG-Medium aufgenommen und ein bis zwei Generationszyklen (20-40 min) bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Dies dient zur Regeneration der Zellen und zur Ausprägung der Resistenz. Anschließend wurde auf Selektivplatten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei inkubiert.

### **3.2.6.7 Isolierung von Plasmid- und BAC-DNA aus transformierten Bakterien**

#### **3.2.6.7.1 Schnellpräparation bakterieller Plasmid-DNA durch Kochlyse**

Zum schnellen Nachweis und zur Charakterisierung rekombinanter Plasmide wurden einzelne Bakterienkolonien in 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Von dieser Übernachtskultur wurden 1,5 ml abgenommen und die Bakterien 2 min bei 8000 U/min abzentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde zum Zellaufschluss in 375 µl STET-Lösung mit Lysozym (10 mg/ml) resuspendiert. Der Ansatz wurde für 45 s auf 100 °C erhitzt. Chromosomale DNA, Zelltrümmer und denaturiertes Protein wurden nach 10-minütiger Zentrifugation bei 12000 U/min mit einer sterilen Pipettenspitze entfernt. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA wurde mit 40 µl 4 M LiCl und 450 µl Isopropanol versetzt und anschließend für mindestens 20 min bei 13000 U/min abzentrifugiert. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 20 µl TE 10/1 mit RNase A (0,05 mg/ml) aufgenommen. Mittels Restriktionsenzymen ( 3.2.6.2) konnte die Plasmid-DNA überprüft und charakterisiert werden.

#### **3.2.6.7.2 Schnellpräparation bakterieller BAC-DNA durch alkalische Lyse**

Für die Präparation kleiner Mengen BAC-DNA (bis 5 µg) wurde die Methode der alkalischen Lyse nach Sambrook et al. (1989) leicht modifiziert. Es wurden 10 ml Chloramphenicol-haltiges LB-Medium mit einem selektierten Bakterienklon von der Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die gewachsene Bakterienkultur wurde am nächsten Tag für 10 min bei 3500 U/min bei 4° C pelletiert (Sigma, 4k10). Nach Absaugen des Überstands wurde das Pellet in 200 µl Qiagen Puffer 1 resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Die Bakterienzellen wurden anschließend durch Zugabe von 400 µl Qiagen-Puffer 2 lysiert (alkalische Lyse) und 5 min auf Eis gestellt. Durch Zugabe von 300 µl Qiagen-Puffer 3 wurde die Lyse gestoppt und 5 min auf Eis inkubiert. Die denaturierten Proteine und die daran assoziierte genomische DNA wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 13000 U/min abgetrennt, der klare Überstand wurde mit einer abgeschnittenen Pipettespitze, um das Scheren der DNA zu vermeiden, vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Ansatz wurde mit dem gleichen Volumen Phenol / Chloroform (Gemisch 1:1) 100 x invertiert. Durch Phenol wird die BAC-DNA von der RNase gereinigt und durch Chloroform

werden Phenolreste aus dem wässrigen Überstand entfernt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Überstand mit abgeschnittenen Pipettenspitzen in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe des gleichen Volumens an Isopropanol gefällt. Nach 20 Minuten Zentrifugation bei 13.000 U/min wurde das Pellet mit 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Die DNA wurde in 30 µl TE10/1 mit RNase A aufgenommen und durch Restriktionsenzymverdau überprüft.

### **3.2.6.7.3 Präparation größerer Mengen Plasmid- und BAC-DNA**

Die Isolierung von größeren Mengen reiner Plasmid-DNA erfolgte mittels des Plasmid-Midi-Kit der Firma Qiagen nach Vorschrift des Herstellers. Bei der Aufreinigung der BAC-DNA wurde das vom Hersteller vorgegebene Protokoll modifiziert. Es wurde die doppelte Menge Puffer 1 bis 3 verwendet und der Elutionspuffer wurde vor dem Gebrauch auf 56 °C erwärmt.

### **3.2.6.7.4 Konservierung von Bakterien mit rekombinanter Plasmid- und BAC-DNA**

Zur dauerhaften Konservierung wurden die Bakterienstämme, die das gewünschte rekombinante Plasmid tragen, über Nacht in 2 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum selektiv vermehrt und anschließend pelletiert (10 min 3000 U/min, Sigma MK 202). Das Pellet wurde in 1 ml Gefriermedium (HMFM) resuspendiert und sofort bei -70 °C gelagert.

### **3.2.7 Proteinnachweis**

#### **3.2.7.1 Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)**

##### **3.2.7.1.1 Färbung intrazellulärer Proteine**

Zur Charakterisierung von viralen Proteinen wurde die indirekte Immunfluoreszenz (IIF) durchgeführt. Dazu wurden Zellen auf Deckgläschen ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die konfluenten Zellen wurden transfiziert bzw. mit einer MOI von 2 bis 5 mit EHV-4 oder EHV-1 infiziert. Nach entsprechender Inkubationszeit wurden die Zellen, nach dem Entfernen des Kulturmediums, mit kaltem PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  gewaschen und anschließend mit eiskaltem 80%igem Azeton für 10 min bei -20 °C fixiert. Nach Abdampfen der Azeton-Reste wurden die Zellen für 10 min mit PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  rehydriert. Zur Verringerung von unspezifischen Antikörper-Bindungsstellen wurden die rehydrierten Zellen für 1h in PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  mit 10 % Roti-Blocking bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde für das Zielprotein-spezifische Serum bzw. die monoklonalen Antikörper in PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  verdünnt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  (3 mal 30 min) wurden die Zellen mit dem fluoreszierenden Sekundärantikörper (anti-rabbit ALEXA Fluor<sup>®</sup>488 bzw. anti-mouse ALEXA Fluor<sup>®</sup>556; Fa. Molecular Probes) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden ungebundene Antikörper durch Waschen mit PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  (s.o.) entfernt. Zum Schluss wurde die anhaftende Flüssigkeit von den Deckgläschen vorsichtig mit Tissue-Papier entfernt und mit der Zellseite nach unten in einen Tropfen PBS/Glyzerin (1:1) auf einen Objektträger gelegt. Zur Versiegelung gegen Austrocknung wurden die Glasplättchen mit Nagellack umrandet und bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die Auswertung der antigenspezifischen Fluoreszenz erfolgte mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (Axioskop 2 Plus, Fa. Zeiss) oder einem Konfokal-Laser-Scan-Mikroskop und wurde digital (Digitalkamera, Spot Diagnostik instruments) dokumentiert.

##### **3.2.7.1.2 Färbung von Proteinen auf der Zelloberfläche**

Bei der Färbung von Proteinen auf der Zelloberfläche soll eine Schädigung der Zellmembran vermieden werden, um ausschließlich die exponierten Epitope eines Proteins detektieren zu



können. Dazu wurden Zellen auf Deckgläschen ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die konfluenten Zellen wurden mit einer MOI von 0,003 infiziert und 90 min im CO<sub>2</sub>-Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Virussuspension durch Methylcellulose (1:1 mit PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> verdünnt) ersetzt. Nach dem Auftreten der ersten Plaques wurde die verdünnte Methylcellulose vorsichtig entfernt, die Zellen mit PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> gewaschen und mit 2 % Paraformaldehyd (PFA in 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und 10 min bei Raumtemperatur mit 50mM NH<sub>4</sub>Cl zum Binden der freien Aldehyde, inkubiert. Zur Verringerung von unspezifischen Antikörper-Bindungsstellen wurden die Zellen für 4h in PBS ohne Ca<sup>2+</sup> mit 10 % Roti-Blocking bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der erste Antikörper (z.B. anti-gH-Serum 1:10000 bzw. anti-gD-MAk 20C4 1:5000) über Nacht bei 4 °C auf die Zellen gegeben. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> (3 mal 30 min) gewaschen und mit dem fluoreszierenden Sekundär-Antikörper (anti-rabbit-Alexa 488, 1:8000 bzw. anti-mouse Alexa, 1:4000; Fa. Molekular Probes) 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die ungebunden Antikörper wurden durch Waschen (PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) entfernt. Um zu Überprüfen, ob die Zelloberfläche noch intakt ist, wurden die Zellen 5 min mit Propidiumjodid gefärbt und anschließend gewaschen. Bei einer Permeabilisierung der Zellmembran färbt das Propidiumjodid die Zellkerne. Weitere Schritte wurden wie unter 3.2.8.1.1 beschrieben durchgeführt.

### **3.2.7.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Für die Auftrennung und Charakterisierung der viralen Proteine wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli (1970) durchgeführt. Für die Elektrophorese wurde das vertikale Gelelektrophoresesystem der Fa. Biorad, München verwendet. Bei dieser Methode werden die denaturierten Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. SDS, ein starkes anionisches Detergenz, zerstört die quartäre Struktur der Proteine, lagert sich an deren hydrophobe Region, verleiht ihnen eine negative Gesamtladung und führt sie durch Zerstörung aller kovalenten Bindungen (z. B. Aufspalten von Wasserstoffbrücken) in eine eindimensionale (gestreckte) Form über. Diese erworbenen Eigenschaften erlauben dem Protein entlang eines elektrischen Feldes zu wandern. SDS-Moleküle binden mit einem konstanten Verhältnis von 1,4 g SDS pro 1 g Protein, so dass eine Auftrennung nach ihrem Molekulargewicht möglich ist (Reynolds und Tanford, 1970 a und b), wobei kleinere Proteine

aufgrund geringerer Reibungskraft schneller durch das Gel wandern können als größere Proteine.

### Herstellung der Gele

Die Gele bestehen aus zwei Komponenten: einem Trenn- und einem Sammelgel. Das Gel wird durch Polymerisation mittels eines Radikalbildners hergestellt. Acrylamid wird nach Zugabe von Ammoniumpersulfat (Amper) und dem Katalysator N,N,N',N'-Tetraminethyldiamin (TEMED) zu einer Gelmatrix vernetzt (Sambrook *et al.*, 1989). Das obere großporige Sammelgel dient der Fokussierung des Proteingemisches vor dem Eintritt in das engporige Trenngel, wo die eigentliche Protein-Auftrennung stattfindet. Die Porengröße des Trenngels wird durch die Acrylamid-Konzentration bestimmt, somit kann man durch Veränderung der Acrylamid-Konzentration Proteine unterschiedlicher Größe trennen. Bei der Untersuchung des Glykoprotein H von EHV-4 mit einer erwarteten Größe von etwa 120 kDa wurden 7%ige und 10%ige Gele verwendet. Die erforderlichen Reagenzien für die Trenn- und Sammelgele sind in der Tabelle 2 angegeben. Für die Elektrophorese wurde eine Biorad Mini-Protean-II-Gelapparatur verwendet. Die Glasplatten und die Spacer (Dicke 1,5 mm) wurden gründlich gereinigt und mit 70%igem Ethanol entfettet. Das noch flüssige vorgemischte Trenngel wurde zwischen die Glasplatten luftblasenfrei gegossen und vorsichtig mit Wasser überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde das Wasser entfernt, das Sammelgel gegossen und mit einem Kamm versehen. Nach der Aushärtung des Sammelgels wurde der Kamm entfernt, das Gel in die Gelapparatur eingesetzt und die Probestaschen mit Elektrophoresepuffer gereinigt.

**Tabelle 2:** Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels

<b>Lösungen</b>	<b>Sammelgel 7 %</b>	<b>Sammelgel 10%</b>	<b>Trenngel 3%</b>
A. dest.	7,80 ml	6,44 ml	3,7 ml
Tris 1,5 M, pH 8,8	3,79 ml	3,79 ml	
Tris 0,5 M, pH 6,8			1,5 ml
SDS 20 %	75 µl	75 µl	30 µl
Acrylamid 30 %	3,185 ml	4,55 ml	0,8 µl
Ammoniumpersulfat 10 %	75 µl	75 µl	45 µl
TEMED	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl
Gesamt-Volumen	15,1 ml	15,1 ml	5,9 ml

### Vorbereitung der Proben

Die Lysate von infizierten Vero-Zellen (3.2.1.3) wurden für die Reduktion von Disulfidbrücken (zwischen Cysteinen) mit 4fach Probenpuffer (enthält  $\beta$ -Mercaptoethanol, eine reduzierende Thiolverbindung) versetzt und vor dem Auftragen auf das Gel 5 min bei 100 °C denaturiert. Zur Ermittlung des Molekulargewichts wurde ein Molekulargewichtsmarker mitgeführt (Fa. Biolabs). Die Banden dieses Markers liegen im Bereich von 175 kDa-6,5 kDa. Nach dem Auftragen der Proben wurde zur Auftrennung der Proteine eine Spannungsquelle angeschlossen. Bis die Protein-Lauffront in das Trenngel eingelaufen ist, wurde eine Spannung von 80 V angelegt, anschließend wurde für ca. 2 Stunden die Spannung auf 100 V erhöht.

### **3.2.7.3 Darstellung von Proteinen durch Coomassie Brilliant Blau-Färbung**

Zur Visualisierung und zur Quantifizierung der Protein-Konzentration des bakteriell-exprimierten gH homologen Proteins wurden die Protein-Banden mittels Coomassie-Blau-Färbelösung sichtbar gemacht. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Polyacrylamidgele für eine Stunde in Coomassie-Färbelösung unter Schütteln inkubiert (Weber und Osborn, 1969) und anschließend so lange, bis sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abhoben, mit einer Coomassie-Entfärbelösung entfärbt. Zur Konservierung wurden die

entfärbten Gele auf Whatman-Filterpapier gelegt und im Gelrockner (Fa. Biometra) für 2 h bei 80 °C getrocknet.

### **3.2.7.4 Elektrotransfer und Immunodetektion von Proteinen (Western Blot)**

Zur Identifizierung spezifischer Proteine innerhalb eines Proteingemischs wurde der Western Blot durchgeführt. Dabei werden die Proteine nach ihrer Auftrennung (SDS-PAGE) durch ein vertikal zum Gel angeordnetes elektrisches Feld auf eine Membran transferiert und dadurch immobilisiert. Dabei binden die Proteine irreversibel an die Membran und können mittels Antikörper detektiert werden. Der Nachweis geschieht indirekt über einen gegen den ersten Antikörper gerichteten Peroxidase-gekoppelten Zweit-Antikörper. Der Proteintransfer erfolgte in einem Tankblotverfahren (Mini Trans-Blot-Apparatur, Fa. Biorad, München). Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das PAGE-Gel, zur Entfernung von SDS, ebensowas wie die Nitrocellulosemembran für 10 Minuten in Towbin-Puffer äquilibriert. Das Gel und die Membran wurden luftblasenfrei aufeinander gelegt, sandwichartig zwischen zwei mit Towbin getränkte Whatmanfilter und Fiber-Pads geklammert und in eine mit gekühltem Towbin-Puffer gefüllte Kammer eingesetzt. Die Übertragung der aufgetrennten (anionischen, denaturierten) Proteine auf die Membran wurde bei einer Gleichspannung von 100 V 60 min lang durchgeführt. Nach dem Proteintransfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 3 h in TBS-T mit 5 % Milchpulver und 2 % FKS bei Raumtemperatur inkubiert. Um Milchpulverreste zu entfernen, wurde die Membran nach dem Blocken dreimal kurz mit TBS-T gewaschen. Im Anschluss daran wurde der primäre Antikörper zugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Das polyklonale Kaninchen-Serum wurde in TBS-T mit 5 % Milch, und die monoklonalen Antikörper in TBS-T mit 0,05 % Natriumacid verdünnt. Nach dreimaligem Waschen (je 30 min) mit TBS-T, zur Entfernung von ungebundenen Antikörpern, wurde die Membran für eine Stunde mit einem gegen den primären Antikörper gerichteten Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper (anti-rabbit-POD bzw. anti-mouse-POD, Verdünnung 1:1000 in TBS-T mit 5 % Milchpulver) bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Nitrocellulosemembran kurz mit TBS-T gewaschen. Die Detektion der gebundenen POD-Antikörper erfolgte mittels Chemilumineszenz (ECL-Reagenz, Fa. Amersham). Die zwei Detektionslösungen wurden im Verhältnis 1:1 gemischt auf die Membran gegeben, diese in Folie luftblasenfrei eingeschweißt und auf einen Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham) exponiert. Durch die Oxidation des zugegebenen Substrats durch die Peroxidase wird Licht emittiert, das einen Röntgenfilm

schwärzt. Die Expositionszeit betrug in Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper 10 Minuten bis 1 Stunde.

### 3.2.8 Bakterielle Expression und Aufreinigung des gH-Proteins von EHV-4

#### 3.2.8.1 Expression

##### Expression von GST-gH Fusionsprotein

Für die Charakterisierung des gH-Proteins von EHV-4 war es notwendig, ein Serum herzustellen. Daher wurde das gH-Protein als Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Für die Expression des rekombinanten Proteins wurden die Expressionsvektoren pGEX-4T1 (Pharmacia) und pBADgIIIA eingesetzt.

pGEX steht als Abkürzung für “**p**lasmid for **G**lutathion-**S**-**E**xpression” und der Vektor kodiert für das Glutathion-S-Transferase-Gen (GST). Wird ein Gen in die “multiple cloning site” (mcs) kloniert, entsteht ein Fusionsprotein mit GST am N-terminalen Proteinende. Das GST-kodierende Gen steht unter der Kontrolle eines Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid (IPTG) induzierbaren Ptac-Promotors (ein Hybrid aus lac- und trp-Promotor). Durch die Bindung eines Repressors, der durch das LacI<sup>q</sup>-Gen gebildet wird, an den Ptac-Promotor wird die Expression des Fusionsproteins unterbunden. Durch die Bindung von IPTG an den Repressor wird die Transkription des Fusionsproteins induziert. Zur Herstellung des Fusionskonstruktes GST-gH wurde der offene Leserahmen des gH-codierenden Gens mittels PCR aus viraler DNA amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde durch die mit Primern eingefügten Sequenzen für Restriktionsendonuclease “*in frame*” in den Vektor pGEX-4T1 kloniert (3.2.7), so dass der für das Protein kodierende Leserahmen des Gens erhalten blieb (“*in frame*-Klonierung”). Das erzeugte Plasmid wurde in *E. coli* (Stamm BL21) transformiert. Diese Bakterien eignen sich besonders zur Expression von Fremdproteinen, da ihnen zwei wichtige Proteasen, die ompT-Gen kodierte Protease der äußeren Membran und die Lon-Gen endoproteolytisch-wirksame Protease, die das exprimierte Protein zerstören könnten, fehlen. Die mit dem erzeugten Plasmid pGEX-gH transformierten BL-21-Zellen wurden über Nacht bei 37 °C in LB-Medium mit Ampicillin-Zusatz (100 mg/l) inkubiert. Die Übernachtskultur wurde 1:10 in frischem LB-Medium mit Ampicillin (100 mg/l) verdünnt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,6 bei 37 °C kultiviert. Durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 2 mM) wurde die Expression des GST-gH Konstruktes induziert und für weitere 3 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurden die Bakterienzellen durch Zentrifugation bei 6000 U/min für 20 min (4 °C) pelletiert und bei -20 °C gelagert.

### Expression des myc-his-gHt-Fusionsprotein

Der andere Vektor, der für die Expression des rekombinanten Proteins eingesetzt wurde, gehört zur pBAD-Familie. Das pBAD-Expressions-System beruht auf dem araBAD-Operon, welches den Arabinose Metabolismus in *E. coli* kontrolliert. Zusammen mit dem araC-Protein ist der pBAD-Promotor für die Regulation des zu exprimierenden Proteins verantwortlich. Das fremde Gen wird an das Hauptpeptid des M13-GenIII-Proteins, welches verantwortlich ist für die Sekretion des rekombinanten Proteins in den periplasmatischen Raum, fusioniert. Das Fusionsprotein wird durch die am C-terminalen-Ende zusätzlich hinzugefügten Polyhistidine-Reste (6xHis) (his-tag) und durch die 10 Aminosäuren des zellulär-homologen myc-onco-Gens (myc-tag) aufgereinigt und mit dem anti-c-myc-Antikörper (Fa. Roche) detektiert. Zur Herstellung des pBADgIII-gH-t Konstruktes wurden 438 Aminosäuren der extrazellulären Domäne des Gens 39 (44 Aminosäuren bis 482 Aminosäuren) aus dem Plasmid pGEX-gH (Kap. 4.1) kloniert (Kap 3.2.7). Das erzeugte Plasmid wurde in *E. coli* (Stamm TOP10) transformiert (Kap 3.2.7.2). Die Expression des rekombinanten Proteins erfolgte durch Zugabe von 0,02 % Arabinose (gleiche Bedingungen wie bei pGEX-gH). Nach 4 h wurden die Bakterienzellen zentrifugiert (s.o.) und bis zur Aufreinigung bei -20 °C gelagert. Zur Kontrolle der Expression wurden jeweils 1 ml der Bakterienkultur vor der Induktion sowie nach der Ernte genommen, für 2 min bei 8000 U/min pelletiert, in 200 µl 8 M Harnstoff aufgenommen und mit 4x Probepuffer versetzt. Davon wurden 15 µl über ein 10%iges SDS-PAGE Gel aufgetrennt. Die Fusionsproteine konnte somit sowohl mit Coomassie-Färbung (3.2.8.3) als auch im Western Blot mittels eines anti-GST-Antikörpers bzw. anti-c-myc-Antikörpers nachgewiesen werden.

### **3.2.8.2 Aufreinigung**

#### Aufreinigung des GST-gH-Fusionsproteins

Für die Gewinnung größerer Mengen des GST-Fusionsproteins wurde ein Liter Bakteriensuspension, wie oben beschrieben, induziert, das Pellet gewonnen und bei - 20 °C

gelagert. Um das bakterielle exprimierte Fusionsprotein aus dem Cytosol zu gewinnen, mussten die Bakterienwände aufgeschlossen werden. Dazu wurde das Pellet in Eiswasser aufgetaut, in 20 ml Lysis-Puffer-B resuspendiert und mit einem Ultraschallstab 7 mal für ca. 20 s auf Eis behandelt. Der Zelldebris wurde durch Zentrifugation (6000 U/min für 30 min, Heraeus Suprafuge, Rotor SS34) von den cytosolischen Bestandteilen getrennt. Der Überstand wurde portioniert und bei - 20 °C eingefroren. Das gewonnene Eluat wurde mit 4x-Probenpuffer versetzt und auf 700 µl in ein 7 % präparatives SDS-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE) aufgetragen (Herstellung siehe 3.2.8.2). Das präparative Gel besitzt eine große Tasche für die Probe und eine kleine für den Marker. Nach der Auftrennung wurden die Gele 30 min in Coomassie-Lösung gefärbt, über Nacht in 30 % Methanol entfärbt, und die gewünschte Protein enthaltende Bande wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und bei - 20 °C eingefroren. Um das Protein in gelöster Form zu gewinnen, wurde eine Elektroelution durchgeführt. Dazu wurde das Elektroelutionsgerät Centrilutor (Fa. Millipore) verwendet. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wandert das negativ geladene Protein aus dem Gel zur Anode bzw. zur Membran des Centricon-Röhrchens. Die ausgeschnittenen Gelbanden wurden 30 min in Elektroelutionspuffer äquilibriert, in das Centricon Ultrafiltrationsröhrchen (Porengrößen von 50 kDa) gegeben und eine Spannung von 300 V für ca. 2 h angelegt. Das elutierte Protein wurde durch Zentrifugation (bei 5000 U/min, für ca. 5 h, Heraeus Suprafuge, Rotor SS34) bis zu einer Konzentration von 200 µg/ml konzentriert. Um den Proteingehalt zu ermitteln und um den Reinheitsgrad zu bestimmen wurde ein Aliquot des konzentrierten aufgereinigten Proteins im SDS-PAGE aufgetragen. Das Fusionsprotein konnte sowohl mit Coomassie-Färbung (3.2.8.3), als auch im Western Blot mittels eines anti-c-myc-Antikörpers nachgewiesen werden.

### Aufreinigung des myc-his-gH-trunk Fusionsproteins

Zur Aufreinigung des myc-his-gHt Konstruktes wurden die mit pBAD-gH transformierten Bakterien, wie unter Abschnitt 3.2.9.1 beschrieben, in großen Mengen induziert. Da dieses Konstrukt an seinem C-Terminus mit einem 6-his-tag (6 Histidine) ausgestattet ist, erfolgte die Aufreinigung über die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie. Diese Aufreinigungsmethode nutzt die starke Affinität des Histidinrestes zu den Nickelionen, die von einer Trägermatrix (Nitroloacetic acid) in einem Koordinationszentrum gehalten werden. Hierbei werden vier der sechs Nickel-Bindungsstellen okkupiert. Die restlichen Bindungsstellen treten in eine Wechselwirkung mit den Histidinresten. Die Bindung des

histidin-markierten Proteins ist sehr stabil, so dass eine Elution des gebundenen Proteins entweder durch pH-Senkung (Histidin wird protoniert) oder durch Konkurrenz mit Imidazol (eine dem Histidin strukturell verwandten Substanz) erfolgen kann. Das nach der Induktion gewonnene Pellet wurde bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren, in Eiswasser aufgetaut und in 20 ml Nickel-Lysis-Puffer (pH 8,0) resuspendiert. Die Bakterien wurden durch Gefriertauen mit flüssigem Stickstoff weiter aufgeschlossen und das gesuchte Protein wurde in die lösliche Phase freigesetzt. Nach Zugabe von PMSF (Endkonzentration 1 mM) wurde die Suspension für 30 min auf Eis unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde, nach Zentrifugation (30 min 10.000 U/min, Heraeus Suprafuge, Rotor SS34) der Überstand auf Nickel-Superflow-Beads (Fa. Qiagen), die zuvor einmal mit A. dest. und zweimal mit Nickel-Lysis-Puffer, pH 8,0, äquilibriert worden waren, gegeben und über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter Schaukeln inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand mit den ungebundenen Proteinen abzentrifugiert (2000 U/min für 10 min, Sigma Kühlzentrifuge 4K10) und entfernt. Das Sediment wurde zweimal für je 30 min mit Nickel-Lysis-Puffer, pH 8,0, und zweimal für je 30 min mit Nickel-Lysis-Puffer, pH 7,0, gewaschen. Die Elution des gebundenen rekombinanten Proteins erfolgte mit je 0,5 ml für 10 min der folgenden Puffer: Puffer D, Puffer E, Imidazol-Puffer und 0,1 M EDTA. Um den Erfolg der Aufreinigung zu kontrollieren wurde ein Aliquot des Eluates in das SDS-PAGE aufgetragen. Das Fusionsprotein konnte sowohl mit Coomassie-Färbung (3.2.8.3), als auch im Western Blot mittels eines anti-c-myc-Antikörpers nachgewiesen werden. Um das rekombinante Protein weiter zu reinigen wurde präparative SDS-PAGE durchgeführt und anschließend das Protein aus dem Gel mittels Elektroelution (Durchführung siehe oben) gelöst.

### **3.2.9 Immunisierung von Kaninchen zur Antikörpergewinnung**

Um ein spezifisches, polyklonales Antiserum gegen das gH-Protein von EHV-4 zu erzeugen, wurden Kaninchen (Chincilla Bastard) mit gereinigten bakteriell-exprimierten Fusionsproteinen (siehe 3.2.9) immunisiert. Dazu wurden 100 µg rekombinantes Protein pro Immunisierung eingesetzt. Um die Immunantwort zu verlängern und zu verstärken, wurde das Antigen mit Freund's Adjuvants (Fa. Sigma), einem Gemisch aus Mykobakterie Zellwandbestandteilen und Mineralöl, im Verhältnis 1:1 vermischt und intramuskulär injiziert. Zur Auffrischung der Immunantwort wurden die Kaninchen 5 bis 6 mal im Abstand von 3 Wochen erneut immunisiert. Sowohl vor der Grundimmunisierung, als auch 10 Tage



nach jeder Immunisierung wurde Blut aus der Ohrvene entnommen. Das gewonnene Blut wurde zur Gerinnung 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend 30 min bei 2000 U/min zentrifugiert. Das Serum wurde portioniert und bis zur weiteren Verwendung bei – 70 °C gelagert.

### **3.2.10 Untersuchung der Glykosilierung viraler Proteine**

#### **3.2.10.1 Deglykosilierung mit N-GlykosidaseF (PNGase F)**

Zur Untersuchung einer möglichen N-Glykosylierung des gH-Proteins wurde ein Verdau mit Peptid N-Glykosidase F durchgeführt. Die PNGase F ist ein Enzym, das in der Lage ist, alle N-Glykane des mannosereichen, hybriden und komplexen Typs zu spalten. Dazu wurden extrazelluläre Virionen aufgereinigt (3.2.2.5) und das Pellet in Deglykosylierungspuffer aufgenommen. Um eine vollständige Abspaltung aller Zuckerreste zu erreichen und somit die Effizienz der Deglykosylierung zu erhöhen, wurden die Proteine zunächst denaturiert. Dazu wurden dem Ansatz SDS (0,1 % Endkonzentration) und  $\beta$ -Mercaptoethanol (1 % Endkonzentration) zugesetzt und 5 min bei 99 °C erhitzt. Nach Zugabe von PNGase F (1  $\mu$ l/100  $\mu$ l) wurde der Ansatz über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Enzym durch Zugabe von 4x Probepuffer und durch Erhitzen (5 min 99 °C) inaktiviert. Die Proteine wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt (3.2.8.2) und mittels Western Blot (3.2.8.4) identifiziert.

#### **3.2.10.2 Deglykosilierung mit Endoglykosidase H (Endo H)**

Zur weiteren Charakterisierung der gH-Proteine wurde Endoglykosidase H verwendet. Dieses Enzym ist in der Lage, spezifisch nur die unreifen, im rauen endoplasmatischen Retikulum gebundene N-glykosidische Oligosaccharide vom High-Mannose-Typ zu spalten. Dazu wurde wie oben beschrieben (3.2.11.2) vorgegangen. Jedoch wurde 3  $\mu$ l Endo H pro 10  $\mu$ l Ansatz zugegeben.

### **3.2.10.3 Inhibition der N-Glykosylierung mit Tunicamycin**

Tunicamycin hemmt die N-Glykosylierung von viralen Proteinen im endoplasmatischen Retikulum (ER). Dazu wurden drei kleine (25 cm<sup>2</sup>) Zellkulturflaschen mit konfluenten Edmin-Zellen mit einer MOI von 2 (EHV-4) infiziert. Nach 90-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde das Medium gewechselt. Zu zwei infizierten Flaschen wurden 5 µl bzw. 10 µl Tunicamycin pro ml Medium zugegeben und bei 37 °C inkubiert. Die dritte Flasche diente als Positivkontrolle. Nach Erscheinen eines deutlichen zpE (ca. 16 h) wurden die Zellen wie unter 3.2.1.3 beschrieben geerntet und im Western Blot untersucht.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Herstellung rekombinanter Plasmide

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Plasmide, die die Sequenz für das gH-kodierende Gen bzw. dessen flankierende virale Sequenzen enthalten, hergestellt.

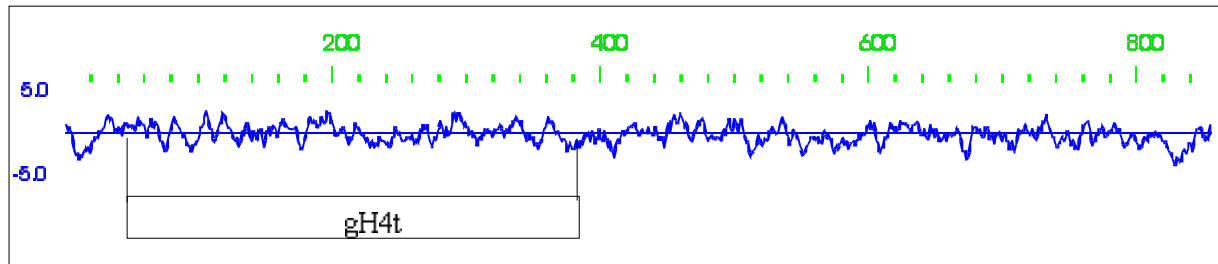
Zur Konstruktion des Plasmids pAmpgH wurde das gesamte gH-Gen (Nukleotid 70858 bis 73425, Telford *et al.*, 1998) aus viraler EHV-4-DNA mittels PCR amplifiziert. Die dabei benutzten Primer (gH4low und gH4up, siehe unter 3.2.7.1) enthielten zusätzlich Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI (5'-terminal) und *Xho*I (3'-terminal). Das entstandene Amplifikat wurde nach Verdau mit den beiden Enzymen in den pcDNAAmp/I-Vektor kloniert (siehe unter 3.2.7). Die korrekte Insertion und Nukleotidfolge des PCR-Amplifikats wurde durch Sequenzanalyse (Fa. MWG-Biotech) und durch Vergleich mit den publizierten Daten (Telford *et al.*, 1998) überprüft.

Das Plasmid pMycgH entstand durch Entlassen des gH-kodierenden Gens über *Bam*HI und *Xho*I aus dem Plasmid pAmpgH und durch Einfügen der Sequenzen in den Vektor pcDNA3.1mycHis(+).A. Hierbei wurde das gH-Gen an der C-terminal eingefügten Sequenz des zellulär-homologen myc-onco-Gens (myc-tag) fusioniert, wodurch die Detektion der Expression des Fusionsproteins mittels eines monoklonalen anti-c-myc-Antikörpers ermöglicht wurde. In beiden Vektoren liegt das gH-Gen unter der Kontrolle des HCMV-IE-Promotors und dient der Expression des gH-Proteins in eukaryotischen Zellen. Außerdem trägt der Vektor pcDNA3.1mycHis(+).A ein Neomycin-Resistenzgen, das für die Selektion transfizierter Zellen über das Aminoglykosidantibiotikum Genizitin (G418) dient.

Für die Herstellung von anti-gH-spezifischen polyklonalen Kaninchen-Seren wurde einmal der gesamte und einmal ein Teil des gH-Leserahmes in zwei entsprechende Expressionsvektoren kloniert. Um das Plasmid pGEX-gH zu erhalten wurde das gesamte gH-Gen über *Bam*HI und *Xho*I aus dem Plasmid pAmpgH in den Vektor pGEX-4T1 kloniert. Dieser Vektor kodiert für das Glutation-S-Transferase-Gen (GST), das unter der Kontrolle eines Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid (IPTG) induzierbaren Ptac-Promotors steht. Nach Transformation des entstandenen Plasmids in Bakterien wird das gH-Protein als N-terminales Fusionsprotein mit GST exprimiert.

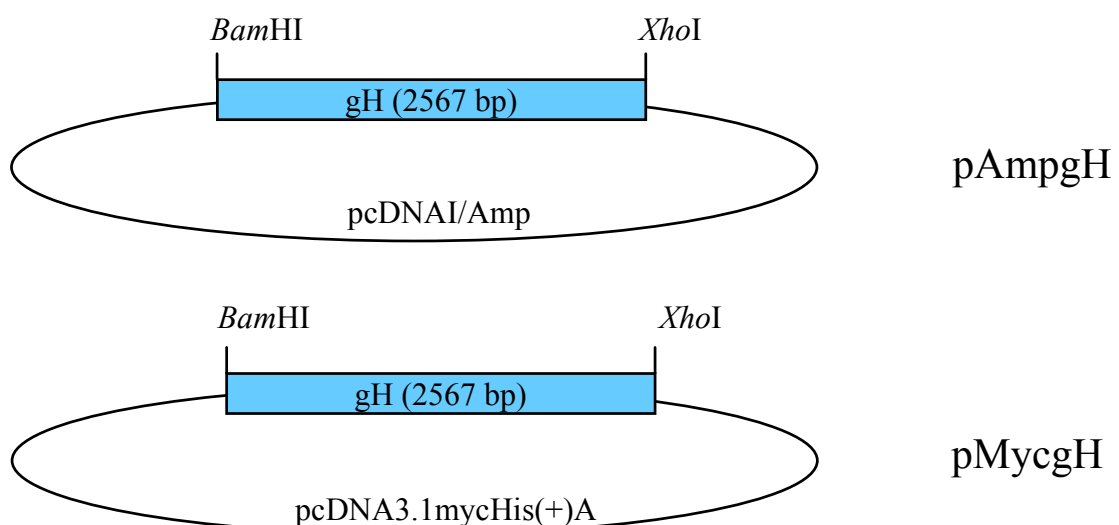
Zur Herstellung des pBADgIII-gHt-Konstruktes wurden 438 Codons des gH-Gens (Aminosäuren 44 bis Aminosäuren 482), ein in der Aminosäuresequenz wenig hydrophober

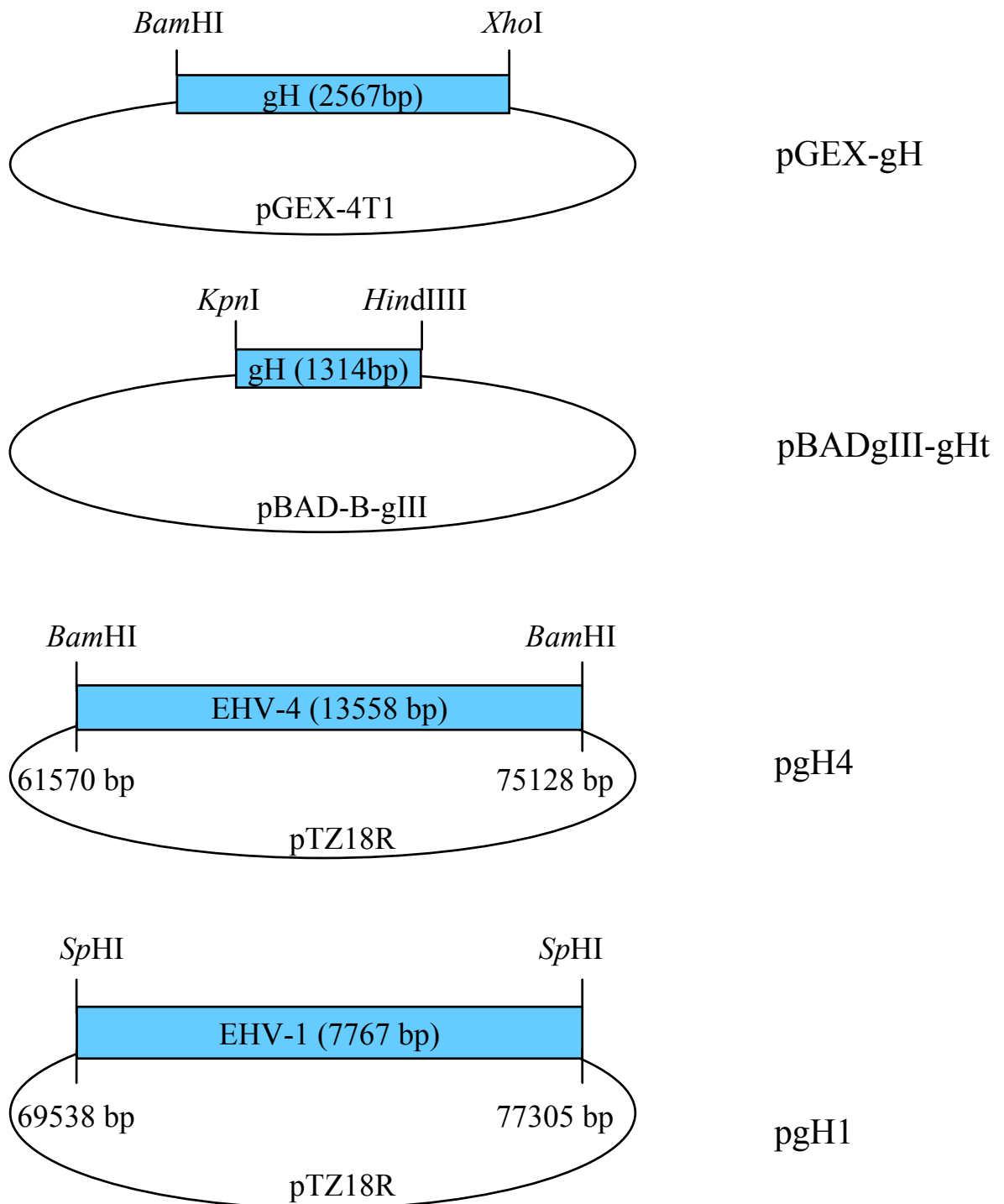
Bereich (s. Abb. 2), aus dem Plasmid pGEX-gH über *KpnI* und *HindIII* in den pBAD-gIII Expressionsvektor kloniert (Kap 3.2.7). Dieses Expressions-System beruht auf dem araBAD-Operon, welches den Arabinose-Metabolismus in *E. coli* kontrolliert. Das erzeugte Plasmid wurde in Bakterien transformiert und das gH-Polypeptid wurde als Fusionsprotein mit am C-terminalen Ende zusätzlich hinzugefügten Polyhistidine-Resten (6xHis) und mit 10 Aminosäuren des zellulär-homologen myc onco-Gens (myc-tag) exprimiert.



**Abbildung 2:** Lokalisation des Fragments der vorhergesagten extrazellulären Domäne des gH-Produkts, das über das Plasmid pBADgIII-gHt exprimiert wurde.

Für die Plasmide pgH4 und pgH1 wurde virale EHV-4- bzw. EHV-1-DNA entsprechend mit dem Restriktionsenzym *BamHI* bzw. *SphI* verdaut. Die entsprechenden 13,5 kb bzw. 7,7 kb großen, das jeweilige gH-Gen und die flankierenden Sequenzen enthaltenden Fragmente wurden jeweils in den Vektor pTZ18R kloniert.





**Abbildung 3:** Darstellung der verwendeten Plasmide. In den Vektor eingefügte Sequenzen sind als Kästen dargestellt. Den Positionsangaben in der EHV-4- bzw. EHV-1-Sequenz liegen die Daten von Telford *et al.*, (1992 und 1998 ) zugrunde.

## 4.2 Vergleich der Aminosäuresequenzen von EHV-1 und EHV-4 gH-Proteinen

Obwohl das Genom von EHV-1 und EHV-4 eine hohe Homologie zeigt und die Identität der Aminosäuresequenzen (AS) je nach Genprodukt zwischen 55 % (Gen 76) und 96 % (Gen 42) liegt (Telford *et al.*, 1998), weisen die beiden Viren deutliche biologische Unterschiede auf. *In vitro* unterscheiden sich die Viren in solchen Parametern wie in der Ausprägung des zytopathischen Effektes, der die Vermehrungskinetik und vor allem auch im Spektrum der Zelllinien, die eine effiziente Replikation erlauben.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die gH-Homologe von EHV-1 und -4 *in vitro* verglichen werden, um eine Beteiligung dieser Proteine an den funktionellen Vorgängen zu analysieren. Um das gH zu charakterisieren, sollte ein anti-gH-spezifisches Serum in Kaninchen erzeugt werden. In einem ersten Schritt wurden die an Hand der Nukleotidsequenz berechneten Aminosäuresequenzen von EHV-1- mit EHV-4-gH verglichen. Dabei wurde die Gesamthomologie bestimmt, sowie ein Bereich guter Sequenz-Übereinstimmung für die Antikörper-Erkennung ausgewählt, um in einem Antiserum beide Proteine nachweisen zu können. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen wurde mit Hilfe des Programms Husar (German Cancer Research Center Heidelberg) durchgeführt (Abb. 4). Der Vergleich der aus der Nukleinsäuresequenz des EHV-1- und EHV-4-gH-Gens abgeleiteten Aminosäuresequenz wies, mit Ausnahme der ersten 30 AS, die der Signalsequenz entsprechen, eine über 85%ige Homologie des EHV-1-gH zu den gH-Aminosäuresequenzen von EHV-4 auf. An Hand eines Hydrophilizitätsblots ließen sich für beide Proteine die Verteilung und die hydrophoben Regionen vorhersagen. (Abb. 5). Zur Herstellung des Konstrukts pBADgIII-gH-t wurde dann ein Abschnitt des gH-Proteins gewählt, der einen hohen Homologie-Grad (bis 98 %) aufwies und gute Antigenität vermuten ließ (Abb. 6).

EHV-1	1	MLQPYRKMLIFAVVTVAFAFAMAVWSTPVPATPSG.....VGNATWA.NNS	43
		.   :   .     .       .	
EHV-4	1	MSQPYLKIAILVAATIVSAIPVWTTTPVSTSPQQTCLHYVGNGTWVHNNT	50
EHV-1	44	FNITRYDKITMGQVYSNTSNSPIFFVVISERNFRIVNTPLGASVFWIPKG	93
		:       :           .	
EHV-4	51	FNVTRYDRITMEPVYNNLSSTTFFVAISERNFRTVNTPLGASVFWILKS	100

EHV-1 94 AMNPPQHQCPCVANGPEPGDPRGPCVNSTVSLLFNENVEPFLMSKNLLEFE 143  
|:|.|||.||||:| | ||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | |  
EHV-4 101 ALNPPKHQPCIANVPEPGDPRGPCVNSTVSLFFNDNLFPFLMTKNLLEFE 150  
**|||||**

EHV-1 144 VLPDTYITGWTFERSKTATTKSNPVGVVLSPPRGSPSANTTIRDDGGPKK 193  
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |  
EHV-4 151 VLPDNYITGWTFERSKTVATKGPNFVGVLSPPRTPSDVNNTIRDDGTPKQ 200  
**|||||**

EHV-1 194 PLSIIDEYTTLVADLQNFTMTLTYSIPFAAVWPPIEAFQTGITVMGCDDTTQ 243  
| | | | |:| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |  
EHV-4 201 HLSIIDEHTTFVLDLQNFTKTLTYISPFPAVWPITAFHAGITVMGCDDTTQ 250  
**|||||**

EHV-1 244 VVAYLGHGFMGLQISSVNNPPLMIVVPNDVSARILNRPSRLRLEPPGP 293  
:| | | | .| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |  
EHV-4 251 AIAYLGNGFMGLQISSVNNPPLMIVAPNDVRARIVNRLPPRRRLEPPGP 300  
**|||||**

EHV-1 294 HAGPIYKVYVLSDGNFYLGHGMSRISREVAAYPEESLDYRYHLSLANLDT 343  
:| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |  
301 YAGPIYKVYVLSDGNFYLGHGMSKISREVAAYPEESLDYRYHLSLANLDT 350  
**|||||**

EHV-1 344 LAMLAELSSGKSTDVSYMYRIVARLAVATFSLAEVIRLSYMLLQEAIID 393  
| | | | | | | | | | | | |:| |:| | | | | | | | | | | | | | | |  
EHV-4 351 LAMLAELSSGKSKDVSYLYRIIARLAVATFSLAEVIRLSYMLLQEAIID 400  
**|||||**

EHV-1 394 VDMNLRLLIVPLVMKYAAGGAADSSYTSSDVAMDQFDVAQSQIEKIVSDIN 443  
| | .| | | | | | | | | | | | | | | | | | |:| | | | | | | | | |  
EHV-4 401 VDINLRLLIVPLVMKYAAGGTADSSYTSSDVAMDQFEVAQAQIEKIVADIN 450  
**|||||**

EHV-1 444 VEAE LRKP MYEHRSLRSVYAYS RKPLPNAVALADR IL IAMYKEAIKDRI 493  
:| | | | | | | | | | |:| | | | | | | | | | | | | | | | | | |  
EHV-4 451 IENELRKPMYEHRSLRSVYAYS RKPLPNAV SFANRL ITAMYKEAIKDRI 500  
**|||||**

EHV-1 494 TWNSTMREVLF FAVGAAAGSHVILTDEPEPGAPAHKDAS FL SLNRNILL 543  
| | | | | | | | | | | | | | | | | :| | | | | | | | | | | | | |  
EHV-4 501 TWNSTMREVLF FAVGAAAGSHVILTDGPD LG LHAKDSS MFL SLNRNILL 550

EHV-1 544 LCTAMCTASHAVSAGLKLEE VMAGLVAGGVQFSLLEV FSPCMASTRFDLA 593  
| | | | | | | | | | | | | | | | | |:| | | | | | | | | | | | | |  
EHV-4 551 LCTAMCTASHAVSAGVKLEE VMAGLIAGGVQFSLLEV FSPCMASARFDLA 600

EHV-1 594 EEEHVLDLLSVIPPRLYTDLNTGFEDDGT TIHSYGRSANGILNSRIAYNF 643  
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |  
EHV-4 601 EEEHVLDLLSVIPPRLYTDLNTGLEDDGT TIHSYGRSANGILNSRIAYNF 650

EHV-1 644 DAVSVFTPELAS CSTKL PKVLVVLPIFTNRSYVITRTAPSIGLTYS LDGV 693  
| | | | | | | | | | | | | | | | | |:| | | | | | | | | | | | | |  
EHV-4 651 DAVRVFTPELAS CSTKL PKVLVVLPLASNRSYVITRTAPNIGLTYS LDGV 700

## Ergebnisse

```

EHV-1 694 NIAKPIVISYITYGNCVSRATIKSGYLDNPGHTQTCVYCGSVFMRYMVS 743
      |||||:|||||:| |||.|||||.|||||
EHV-4 701 NIAKPIVISYITYGNCQVSRATIRSVYLDHPGHTQSCVYCGSVFMRYMAS 750

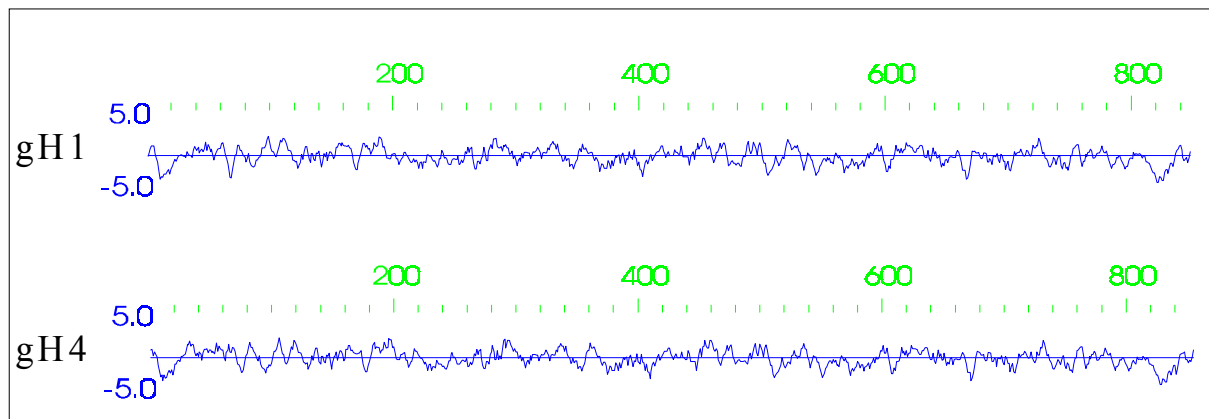
EHV-1 744 GAIMDLIYIDDKEVELQLVAGENSTIPAFNPKLYTPSMNALLMFPNGTVT 793
      |||||:|||||
EHV-4 751 GAIMDLIYIDDKDVELQLVAGENSTIPAFNPKLYTPSMNALLMFPNGTVT 800

EHV-1 794 LMSAFASYSSFKVPSTYLWASIGGLLAILILYIIKMLCGGVTNDGYKL 843
      |||||.||:|||||:|:||||| |. | |
EHV-4 801 LMSAFASYSAFKIPSTYLWASIGGLLAILILYVIVKMLCGGVINNDYSL 850

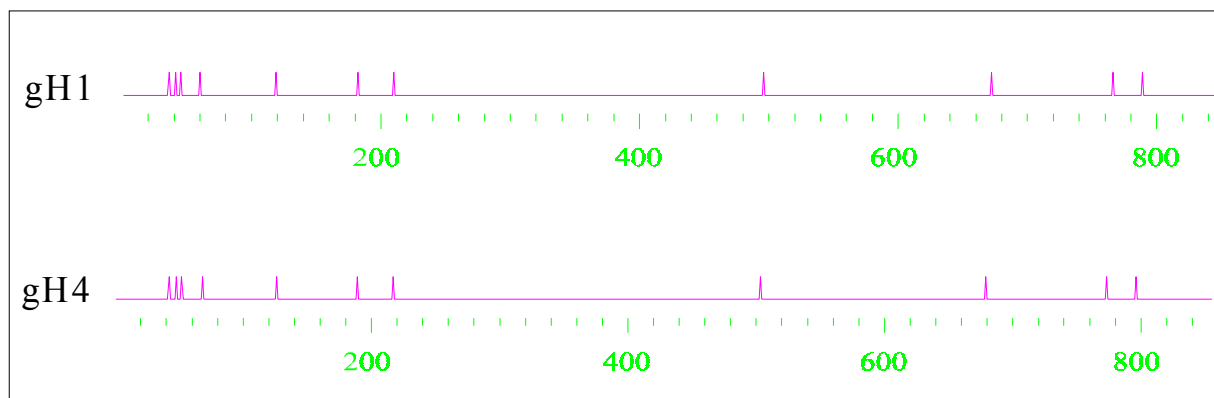
EHV-1 844 LLSYE* 849
      ||. ||
EHV-4 851 LLNSE* 856

```

**Abbildung 4:** Die nach den Nukleotidsequenzen bestimmten Aminosäuresequenzen der gH-Proteine von EHV-1 und EHV-4. Der für die Immunisierung von Kaninchen exprimierte Bereich des EHV-4-Proteins ist unterstrichen.



**Abbildung 5:** Hydrophilizitätsblots von gH bei EHV-1 und EHV-4. Die über der Null-Linie liegenden Bereiche der Proteine sind hydrophil, während die hydrophoben Bereiche unter der Null-Linie dargestellt sind.



**Abbildung 6:** Vergleich der Lokalisation der möglichen N-Glykosilierungsstellen der EHV-1- und EHV-4-gH-Glykoproteine.



### 4.3 Charakterisierung des gH-Proteins im Western Blot

#### 4.3.1 Herstellung eines EHV-4-gH spezifischen polyklonalen Antiserums

Um das Produkt des EHV-4-Gen 39 (gH) in seiner Struktur und Funktion zu untersuchen, sollte ein anti-gH-spezifisches Serum in Kaninchen erzeugt werden.

Zunächst wurde das gesamte für das gH kodierende Gen in den Vektor pGEX-4T1 kloniert (siehe Kap. 4.1). Das erzeugte Plasmid pGEX-gH wurde wie unter 3.2.9.1 beschrieben in den *E.-coli*-Stamm BL21 transformiert. Nach Zugabe von IPTG wurde das Fusionsprotein exprimiert. Die Expression wurde sowohl in mit Coomassie-Brillant-Blue-gefärbten SDS-PAGE-Gelen als auch im Western Blot mittels eines anti-GST-Antikörpers überprüft. Das Fusionsprotein GST-gH wurde dabei als Bande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von ca. 120 kDa detektiert. Da die Expressionsrate sehr gering war, wurde das Fusionsprotein ausschließlich über präparative SDS-Gele mit nachfolgender Elektroelution aufgereinigt (siehe Kap. 3.2.9.2). Um den Proteingehalt zu ermitteln und um den Reinheitsgrad zu bestimmen, wurde ein Aliquot des konzentrierten eluierten Proteins im SDS-PAGE-Gel aufgetragen und mit Coomassie-Brillant-Blue gefärbt. Mit je 50-100 µg der so aufgereinigten Proteine wurde ein Kaninchen wie unter 3.2.10 beschrieben immunisiert. Das auf diese Weise erzeugte Serum wurde für die Charakterisierung des gH-Proteins im Western Blot und in der indirekten Immunfluoreszenz eingesetzt.

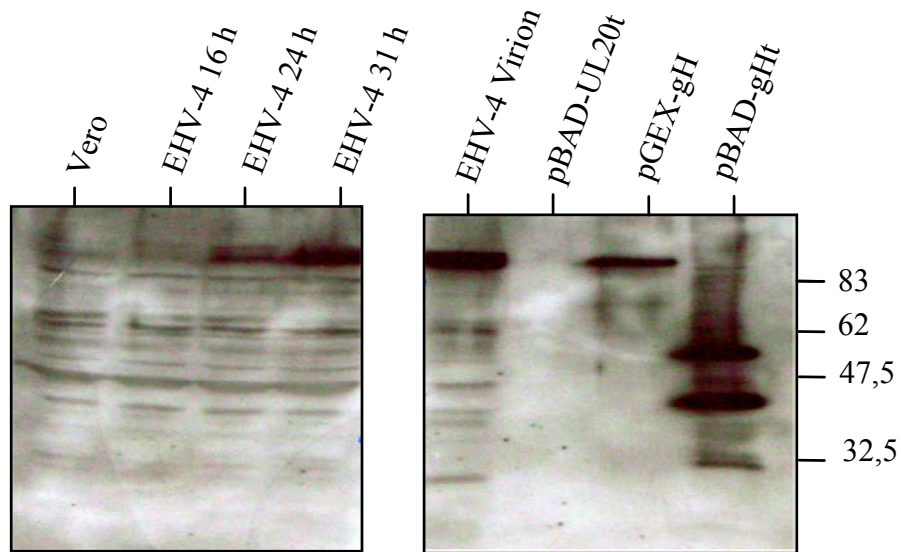
Auf Grund der Protein-Größe, die vermutlich verantwortlich für die geringe Expressionsrate sowie den hohen Degradationsgrad während der Protein-Aufreinigung war, wurde zusätzlich das rekombinante Plasmid pBADgIII-gHt für die Expression eines kleineren Sequenzabschnitts des gH-Gens eingesetzt (4.1). Das Plasmid wurde ebenfalls in Bakterien transformiert und das trunkierte Fusionsprotein, das am C-terminalen Ende einen 6His-Tag und das myc-Epitop trägt, exprimiert. In Lysaten induzierter Bakterien konnte sowohl in Coomassie-Brillant-Blue-Färbung als auch im Western Blot die erwartete Proteinbande mit einer Größe von ca. 50 kDa und eine zusätzliche Bande von ca. 40 kDa detektiert werden. Genauere Analysen der Nukleotid-Sequenz zeigten, dass innerhalb des exprimierten Gen-Abschnitts ein zusätzliches Start-Codon (an der Position 71280) vorhanden ist, welches für die Expression des 40 kDa Proteins verantwortlich sein könnte. Da eine affinitätschromatographische Aufreinigung, wie unter 3.2.9.2 beschrieben, keine genügende Reinheit der beiden Proteinbanden erbrachte, wurden die Fusionsproteine anschließend über präparative SDS-PAGE-Gele und darauffolgende Elektroelution voneinander getrennt und

aufgereinigt. Die eluierten Proteine wurden für die Immunisierung zweier Kaninchen (siehe Kap. 3.2.10) verwendet.

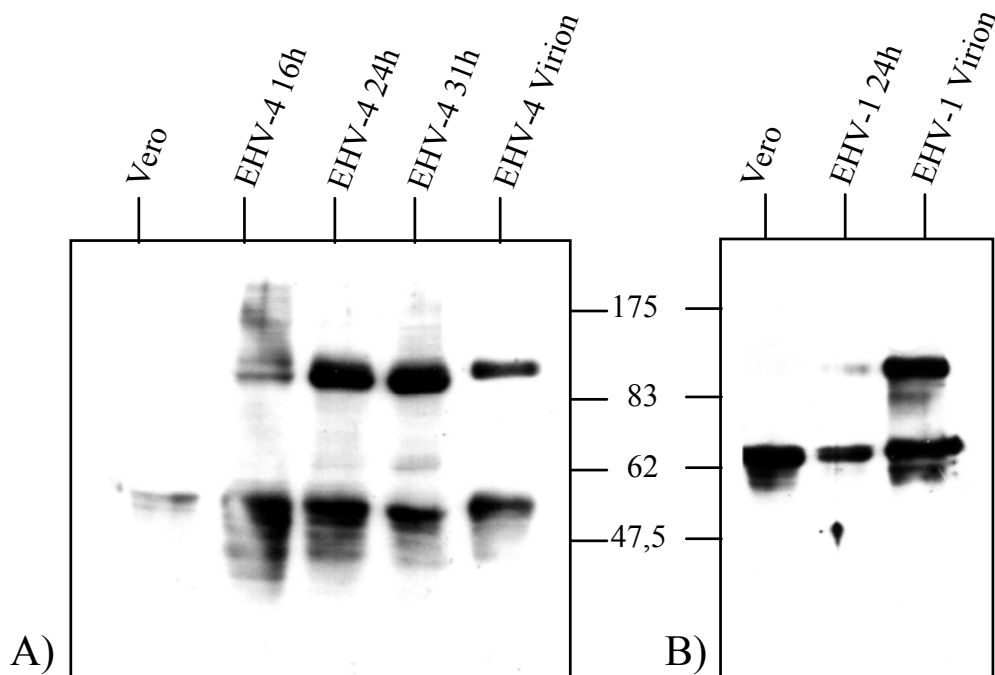
### **4.3.2 Nachweis des EHV-4 und EHV-1 gH-Proteins im Western Blot**

Die erzeugten Seren (anti-gH und anti-gHt) wurden zunächst auf spezifische Reaktivität gegen das EHV-4-gH im Western Blot untersucht. Als Proben dienten Lysate EHV-4-infizierter und nicht infizierter Vero-Zellen und aufgereinigter Virionen. Zur Herstellung der Lysate wurden Vero-Zellen mit einer MOI von 3 mit EHV-4 infiziert und 16, 24 und 31 h nach der Infektion lysiert (siehe unter 3.2.1.3). Die Spezifität der Seren wurde mit einem Präimmunserum, das vor der ersten Immunisierung gewonnen worden war, verglichen (nicht gezeigt). Beide anti-gH-Seren reagierten ab der vierten Immunisierung mit gH-spezifischen Proteinbanden. Das anti-gH-Serum wurde jedoch für die folgende Western-Blot-Analyse nicht weiter eingesetzt, da es starke unspezifische Reaktivitäten sowohl mit viralen als auch mit zahlreichen zellulären Proteinen zeigte (s. Abb. 7). Das anti-gHt-Serum des Kaninchens, das mit den 40 kDa aufreinigten Protein immunisiert worden war, detektierte in Lysaten EHV-4-infizierter Vero-Zellen zwei Proteinbanden mit apparentem Molekulargewicht von 130 und 140 kDa. Das gewonnene Serum reagierte mit aufgereinigten Virionen nur mit einer 140 kDa großen Proteinbande. In Lysaten nicht infizierter Zellen blieben diese Banden aus (s. Abb. 8 A).

Das anti-gHt-Serum zeigte außerdem eine spezifische Reaktion sowohl mit Lysaten von Zellen, die mit dem EHV-1-Stamm RacL22 infiziert wurden, als auch mit aufgereinigten EHV-1-Virionen (s. Abb. 8 B).



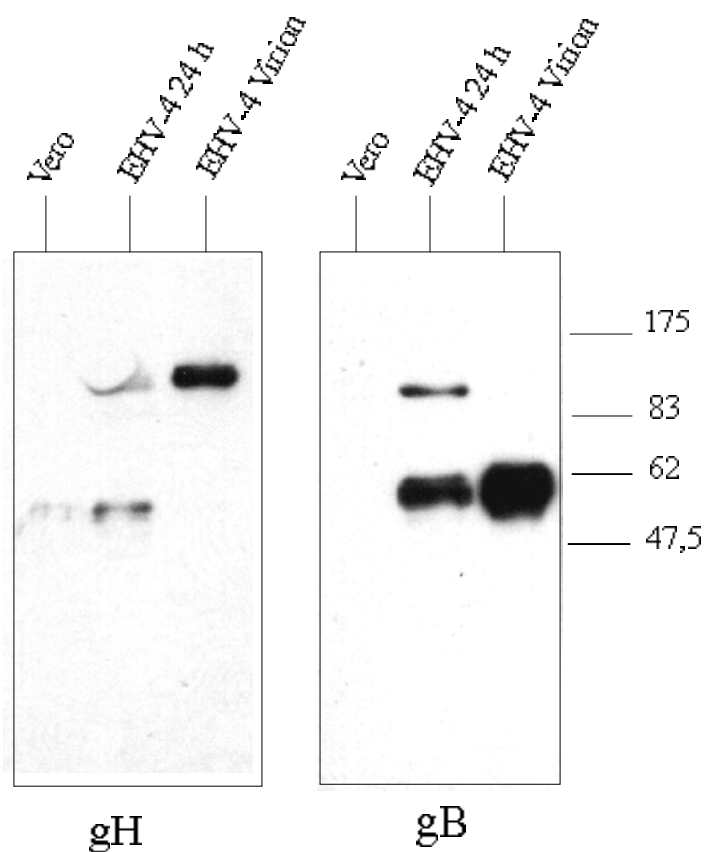
**Abbildung 7:** Das erzeugte anti-gH-Serum reagierte im Western Blot mit dem rekombinant bakteriell exprimierten gH-Protein (Spur: pGEX-gH), mit einem 140 kDa großen Protein in aufgereinigten Virionen (Spur: EHV-4-Virion) und mit Lysaten EHV-4-infizierter Vero-Zellen (Spur: EHV-4 8 h, EHV-4 14 h, EHV-4 24 h). Mit Lysaten nicht infizierter Zellen zeigte sich eine unspezifische Reaktion.



**Abbildung 8: A):** Das gewonnene anti-gHt-Serum zeigte im Western Blot mit Lysaten EHV-4-infizierter Vero-Zellen eine spezifische Reaktion in Form von zwei Banden mit apparenten Molekulargewichten von 130 und 140 kDa (Spur EHV-4 16, 24, 31 h). Mit aufgereinigten Virionen (Spur: EHV-4 Virion) reagierte das Serum spezifisch mit einer 140 kDa großen Proteinbande. In nicht infizierten Zellen zeigte das Serum keine spezifische Reaktion (Spur: Vero Mock) (10% SDS-PAGE, anti-gHt 1:2000). **B):** Lysate EHV-1-infizierter Vero-Zellen (Spur RacL22 24 h) wie auch aufgereinigter Virionen (Spur EHV-1-Virion) zeigten ebenso eine Reaktion.

### 4.3.3 Untersuchung aufgereinigter Virionen auf die Anwesenheit des gH-Proteins

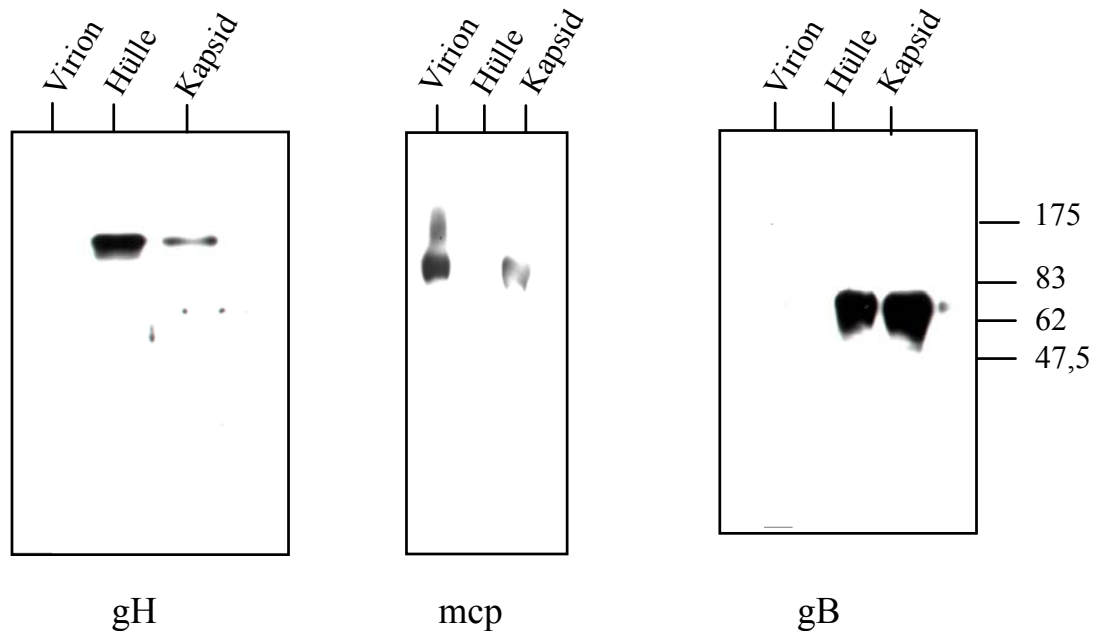
Um die initialen Hinweise zu bestätigen, dass das Glykoprotein H zur Gruppe der viralen Strukturproteine gehört, wurden neben EHV-4-infizierten Zelllysaten auch Virionen aus dem Überstand EHV-4-infizierter Zellen aufgereinigt (s. 3.2.2.5). Die Proben wurden im Western Blot auf eine Reaktion mit dem anti-gHt-Serum untersucht. Zur Kontrolle der Reinheit der Präparation wurden die Proben parallel mit dem MAk 3F6 untersucht. Dieser MAk detektiert das Glykoprotein B (gB). Eine Verunreinigung der aufgereinigten extrazellulären Virionen mit intrazellulären viralen Proteinen konnte auf Grund der Abwesenheit einer gB-Vorläufer-Proteinbande ausgeschlossen werden. In diesen Versuchen konnte bestätigt werden, dass das gH-Protein in EHV-4-Virionen als Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 140 kDa nachgewiesen wird (Abb. 9).



**Abbildung 9:** Western-Blot-Analyse aus dem Überstand infizierter Zellen aufgereinigter Virionen. Parallele Blots wurden mit dem anti-gHt-Serum und dem anti-gB-MAk 3F6 inkubiert. Das gH-Protein konnte als Bestandteil extrazellulärer Virionen identifiziert werden. (10 % SDS-PAGE, anti-gHt-Serum 1:2000; MAk 3F6 1:5000).

#### 4.3.4 Das gH-Protein ist Bestandteil der Virus-Hülle

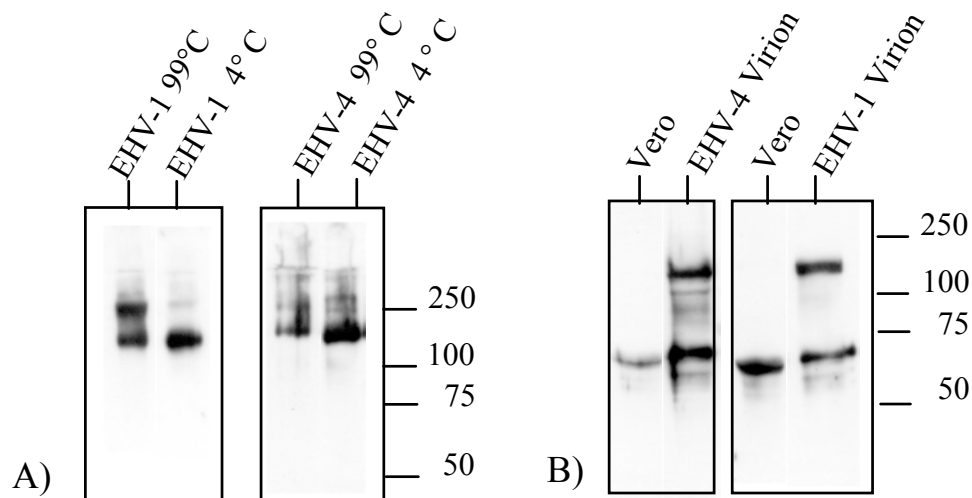
Um das gH-Protein innerhalb der Virionen zu lokalisieren, wurden die aufgereinigten Viruspartikel nach Behandlung mit Triton X-100 durch Ultrazentrifugation in eine Hüll- und eine Kapsid-Fraktion getrennt (s. 3.2.2.6 ). Die zwei Fraktionen wurden im Western Blot untersucht. Das gH-Protein konnte in der Virion-Hülle nachgewiesen werden. Die saubere Auftrennung der Virionen wurde mit dem anti-gB-MAk 3F6, der das Hüllprotein gB detektiert, und dem MAk ZB4, der das Hauptkapsidprotein (*“major capsid protein”, mcp*) detektiert, überprüft (Abb. 10).



**Abbildung 10:** Nach Behandlung der aufgereinigten EHV-4-Virionen mit Triton X-100 und deren Auftrennung in Hüll- und Kapsid-Fraktion wurden die Proben im Western Blot analysiert. Identische Blots wurden mit anti-gHt-Serum, anti-gB-MAk 3F6 oder anti-mcp-MAk ZB4 inkubiert. Das gH-Protein war, wie das Hüllprotein gB, ausschließlich in der Hüllfraktion zu finden. Das Hauptkapsidprotein mcp konnte nur in der Kapsidfraktion nachgewiesen werden (10 % SDS-PAGE, anti-gHt-Serum 1:2000, MAk 3F6 1:5000, MAk ZB4 1:100).

#### 4.3.5 Nachweis des gH-Proteins unter nicht denaturierenden Bedingungen

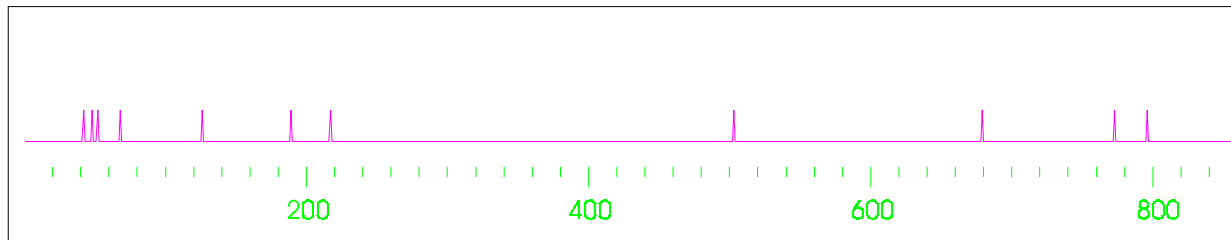
Um zu überprüfen, ob das gH-Protein mit sich oder mit anderen viralen Proteinen über Disulfidbrücken Komplexe bildet, wurden aufgereinigte EHV-1- und EHV-4-Virionen in nicht reduzierendem Probenpuffer, der kein  $\beta$ -Mercaptoethanol enthält, aufgenommen und; sowohl 5 min auf 99 °C erhitzt als auch bei 4 °C gehalten, auf 12 % SDS-PAGE-Gele aufgetragen. Durch das Kochen werden die Disulfidbrücken zerstört. Nach der Auftrennung wurden die Proben mit dem anti-gHt-Serum untersucht. Dabei konnte sowohl in den gekochten als auch in den nicht gekochten EHV-1- und EHV-4-Proben die erwartete Proteinbande mit einer Größe von ca. 140 kDa und eine zusätzliche Bande von über 250 kDa detektiert werden (Abb. 11). Diese Ergebnisse zeigen, dass die gH-Proteine beider Viren Komplexe höherer Ordnung eingehen. Ob es sich dabei um Homo- oder Hetero-Oligomere handelt, lässt sich auf Grund der vorliegenden Daten nicht sagen.



**Abbildung 11:** Western-Blot-Analyse von aufgereinigten EHV-1- und EHV-4-Virionen unter nicht denaturierenden Bedingungen. **A):** In nicht reduzierendem Probenpuffer aufgenommene, aufgereinigte EHV-1- und EHV-4-Virionen konnten sowohl in bei 99 °C als auch bei 4 °C behandelten Proben zwei Proteinbanden (140 und über 250 kDa) nachgewiesen werden. **B):** Unter reduzierenden Bedingungen konnte nur eine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 140 kDa nachgewiesen werden (12 % SDS-PAGE-Gel, anti-gHt-Serum 1:2000).

#### 4.3.6 Nachweis der N-Glykosilierung des gH-Proteins nach Behandlung mit N-GlykosidaseF (PNGase F) und Endoglykosidase H (Endo H)

Während und nach der Synthese im rER werden sowohl zelluläre als auch virale Proteine, die entsprechende Signalsequenzen tragen, durch ko- oder posttranslationale Glykosilierung zunächst im ER und dann später im Golgi-Apparat endgültig modifiziert. In der Aminosäure-Sequenz des gH-Proteins wurden 11 Konsensus-Stellen für N-Glykosilierung identifiziert (s. Abb. 12).



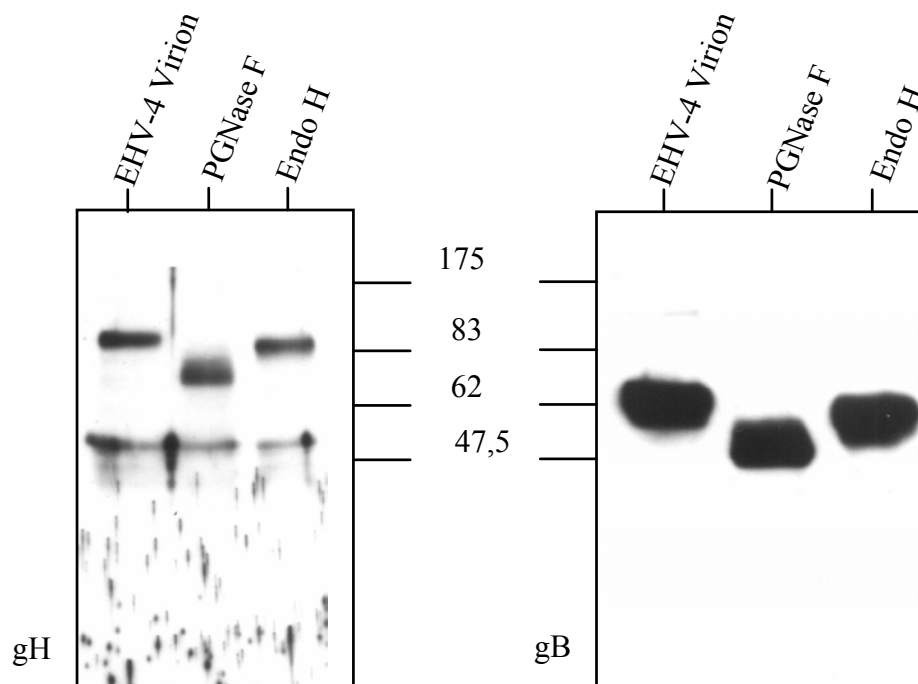
**Abbildung 12:** Lokalisation der N-Glykosilierungsstellen im hydrophilen Bereich des gH-Proteins.

Um EHV-4-gH auf eine mögliche N-Glykosylierung zu untersuchen, wurde ein Verdau aufgereinigter Virionen mit Peptid N-GlykosidaseF (PNGase F) und Endoglykosidase H (Endo H) durchgeführt. Die PNGase F ist ein Enzym, das in der Lage ist, alle Typen Asparagin-gebundener N-Glykanketten in Ammoniak und Asparaginsäure zu spalten und somit alle mannosereichen, hybriden und komplexen Kohlehydrat-Seiten-Ketten anzugreifen. Die Endo H weist eine engere Substratspezifität auf und spaltet nur unreife, im rauen endoplasmatischen Retikulum angefügte N-glykosidische Oligosaccharide vom „*High-Mannose-Typ*“. Das Reaktionszentrum dieses Enzyms liegt zwischen den N-Acetylglucosamin-Molekülen. Durch Einsatz dieser, die Zuckerreste modifizierenden Enzyme, wird die Unterscheidung einer reifen von einer unvollständig prozessierten Form eines Proteins möglich. Extrazelluläre EHV-4-Virionen wurden aufgereinigt (3.2.2.5), mit PNGase F bzw. Endo H verdaut und im Anschluss im Western Blot auf Veränderungen des Laufmusters untersucht. Um festzustellen, ob die zu beobachtende unterschiedliche Mobilität der Proteine im Gel tatsächlich nur durch die Enzyme bedingt waren, wurde zum Vergleich ein weiteres Aliquot der Virionen nur mit dem jeweiligen Deglykosilierungspuffer ohne Zusatz von Enzymen inkubiert und analysiert. Als Kontrolle für eine prinzipiell erfolgreiche De-N-Glykosilierung wurde der MAk 3F6 verwendet. EHV-4-gB ist bekanntermaßen

glykosiliert (Merdith *et al.*, 1989), so dass eine definierte Abweichung des apparenten Molekulargewichts des gB erwartet wurde. Bei der Detektion des gH mit dem anti-gHt-Serum konnte, wie auch bei gB, nach der Deglykosilierung eine erhöhte elektrophoretische Mobilität im Gel festgestellt werden.

Das Molekulargewicht des EHV-4-gH wurde nach Behandlung mit PNGase F von 140 auf 95 kDa reduziert. Dieses Ergebnis bewies, dass das gH-Protein erheblich durch N-Glykosilierung modifiziert ist. Die 95 kDa große Proteinbande stellt die deglykosilierte Form des Proteins dar und stimmt mit der Größe des errechneten Translationsprodukts von 94.1 kDa überein.

Bei der Untersuchung nach Behandlung mit Endo H konnte eine 130 kDa große Proteinbande detektiert werden. Daraus kann man schließen, dass diese Proteinbande, die auch in Lysaten infizierter Zellen auftritt (s. o.), die unvollständig prozessierte Form des gH-Proteins darstellt (Abb. 13) und dass das gH vermutlich unvollständig prozessiert in den Virionen eingebaut wird.



**Abbildung 13:** Untersuchung des gH-Proteins im Western Blot nach Deglykosilierung mit PNGase F und Endo H. Zum Nachweis der N-Glykosilierung des gH-Proteins wurden aufgereinigte EHV-4-Virionen nach Behandlung mit PNGase F (Spur: PNGase F) bzw. Endo H (Spur: Endo H) im Western Blot untersucht. Parallele Membranen wurden mit anti-gHt-Serum oder anti-gB-MAk 3F6 inkubiert. Das Molekulargewicht des EHV-4-gH wurde nach Behandlung mit PNGase F von 140 auf 95 kDa reduziert. Zum Vergleich dienten Virionen, die ohne Zusatz von Enzymen inkubiert wurden (Spur: EHV-4 Virion). (10 % SDS-PAGE, anti-gHt-Serum 1:2000, MAk 3F6 1:5000).

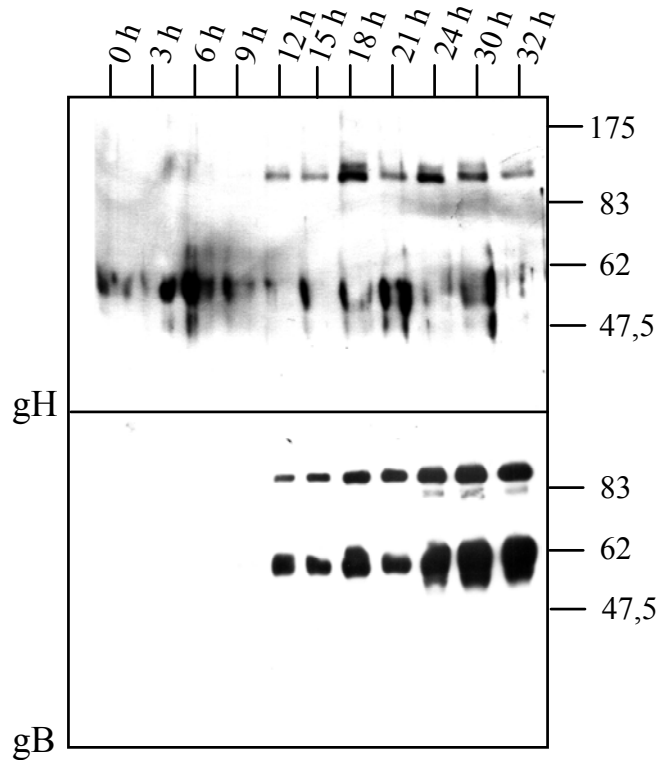


#### **4.3.7 Kinetik der Expression des gH-Proteins im Verlauf einer EHV-1- und EHV-4-Infektion**

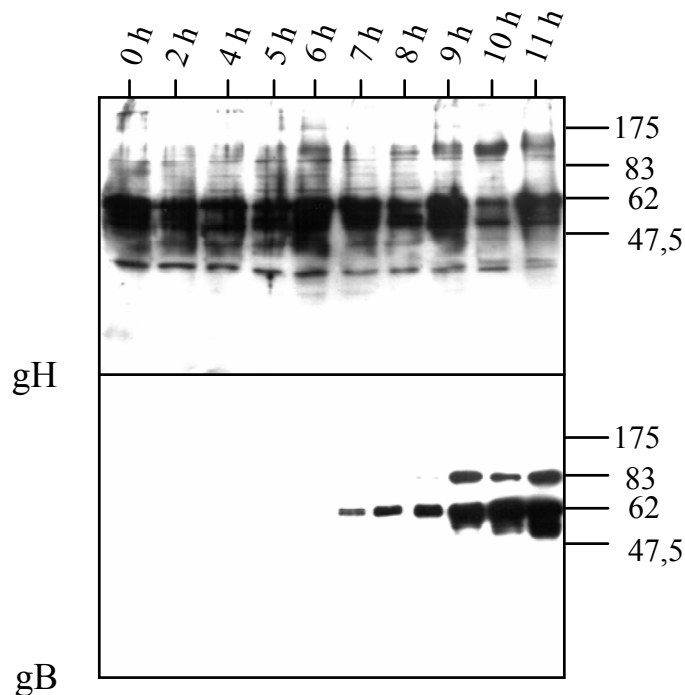
Um eine Aussage über die Produktion des gH-Proteins im Verlauf einer EHV-4-Infektion machen zu können, wurden Vero-Zellen mit EHV-4 mit einer MOI von 3 infiziert und zu bestimmten Zeitpunkten (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 30, und 32 h) nach der Infektion geerntet. In Western Blot-Analyse dieser Lysate konnte das gH-Protein in beiden Formen, 130 und 140 kDa, frühestens 12 h nach der Infektion nachgewiesen werden. Während die Intensität der 130 kDa Proteinbande im Verlauf der Infektion kontinuierlich abnahm, stieg die Intensität der 140 kDa Proteinbande an. Die Reaktion der 140 kDa Proteinbande nahm bis 24 h p.i. an Stärke zu (s. Abb. 14). Die Abnahme der Expression der 130 kDa Bande, bei Zunahme der 140 kDa Form, unterstrich die Richtigkeit der Interpretation der Deglykosilierungs-Daten. EHV-4-gH wird zunächst im ER auf 130 kDa glykosiliert und im Anschluss im Golgi-Apparat ausprozessiert, was zur Detektion einer 140 kDa Bande führt.

Um den Verlauf der Expression des gH-Proteins bei EHV-1- und bei EHV-4-Infektionen zu vergleichen, wurden Rk13-Zellen mit dem Stamm RacL11 mit einer MOI von 5 infiziert. Die Zellen wurden zu bestimmten Zeitpunkten (0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18 h) nach der Infektion lysiert und im Western Blot untersucht. Eine spezifische Reaktivität des gH-Proteins konnte frühestens 5 h nach der Infektion nachgewiesen werden (Abb. 15 A).

Als Kontrolle für die Qualität der in der jeweiligen Expressionskinetik eingesetzten Lysate von infizierten Zellen diente der anti-EHV-1-gB-MAk 3F6. Das Glykoprotein B wurde ebenfalls ab 12 h bei EHV-4 bzw ab 5 h bei EHV-1 p.i detektiert (Abb. 14 und 15 B). Da das gB als “*early-late*”-Protein bekannt ist, geben diese vergleichenden Experimente Hinweise darauf, dass das gH in die gleiche Klasse der Protein-Expression fallen könnte. Außerdem weisen die Ergebnisse dieser Kinetiken darauf hin, dass sich EHV-4 in Vero-Zellen anders verhält bzw. langsamer repliziert, als EHV-1 in den für die EHV-1-Replikation optimalen Rk13-Zellen.



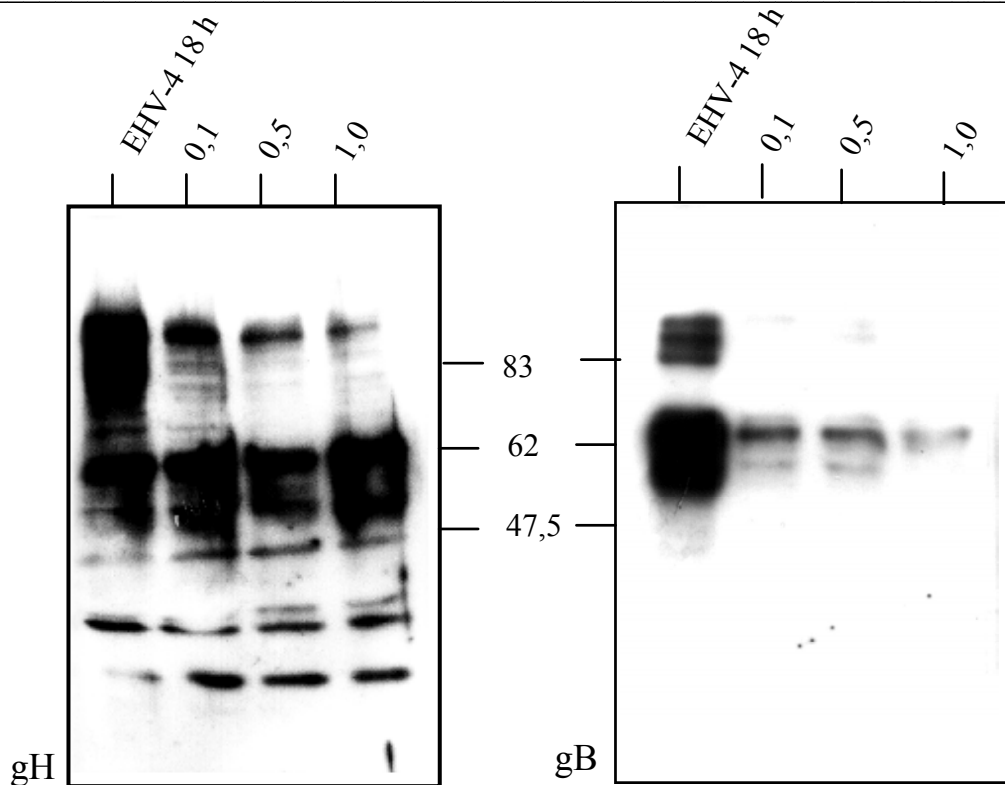
**Abbildung 14:** Zur Darstellung der Expressionskinetik des gH-Proteins wurden Lysate EHV-4-infizierter Vero-Zellen zu den angegebenen Zeiten gewonnen und im Western Blot analysiert. Parallele Blots wurden auf gH oder gB untersucht (12 % SDS-PAGE, anti-gHt-Serum 1:2000, anti-gB-MAk (3F6) 1:5000).



**Abbildung 15:** Darstellung der Produktion des gH im Verlauf einer EHV-1-Infektion im Vergleich zur Expression des gB. Dabei wurden EHV-1-infizierte Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert und im Western Blot mit dem anti-gHt-Serum untersucht. Als Kontrolle für die Qualität der eingesetzten Lysate dient das gB (12 % SDS-PAGE, anti-gHt-Serum 1:2000, anti-gB-MAk (3F6) 1:5000).

#### 4.3.8 Das gH gehört zur Klasse der $\gamma$ -Proteine

Die Expression der viralen Gene verläuft kaskadenartig, und zahlreiche positive und negative Feedback-Mechanismen sorgen für eine zeitliche und quantitative Regulation. Entsprechend der zeitlichen Expression werden drei Gruppen von Genen unterschieden:  $\alpha$ - (“*immediate-early*”),  $\beta$ - (“*early*”),  $\gamma$ - (“*late*”) Gene. Die  $\gamma$ -Gene kodieren hauptsächlich für die stark immunogenen Hauptstrukturproteine, die sowohl während als auch nach der DNA-Replikation synthetisiert werden. Die  $\gamma$ -Gene werden in zwei Subklassen unterteilt, die  $\gamma_1$ - (“*early-late*”) und die  $\gamma_2$ - (“*true-late*”) -Gene, deren Expression vom Ausmaß der viralen DNA-Synthese abhängt. Durch den Einsatz des DNA-Synthese-Inhibitors Phosphonoessigsäure (PAA) kann die Zugehörigkeit eines Proteins zu einer dieser zwei Unterklassen bestimmt werden. Dabei wird die Stärke der Expression des  $\gamma_1$ -Proteins durch PAA deutlich, aber nicht vollständig beeinflusst, während bei einer vollständigen Hemmung der DNA-Synthese die  $\gamma_2$ -Gene nicht mehr exprimiert werden. Um die Zugehörigkeit des gH-Proteins zu einer der zwei Subklassen zu bestimmen, wurden EHV-4-infizierte Vero-Zellen mit einer steigenden PAA-Konzentration (0,1; 0,5 und 1,0 mg/ml Medium) inkubiert, nach 16 h geerntet und der Expressionslevel im Western Blot verglichen. Wie aus Abb. 16 hervorgeht, konnte die Expression des gH auch bei hohen PAA Konzentrationen zwar deutlich, jedoch nicht vollständig unterdrückt werden. Zur Kontrolle wurden die Lysate auch mit dem anti-gB-MAk 3F6 untersucht. Die Expression des bekannten  $\gamma_1$ -Protein gB konnte wie erwartet auch nicht vollständig gehemmt werden.



**Abbildung 16:** Nachweis des gH in EHV-4-infizierten, PAA behandelten Vero-Zellen. Dazu wurden EHV-4-infizierte Vero-Zellen mit einer steigenden PAA-Konzentration (0,1, 0,5 und 1 mg/ml) inkubiert und anschließend die Zelllysate im Western Blot eingesetzt. Parallele Blots wurden mit dem anti-gHt-Serum oder dem anti-gB-MAK 3F6 inkubiert. Zur Kontrolle der Expression wurden Lysate EHV-4-infizierter Zellen ohne PAA verwendet (Spur: EHV-4 18 h) (10 % SDS-PAGE, anti-gHt-Serum 1:2000, MAK 3F6 1:5000).

#### 4.4 Charakterisierung des gH-Proteins in der indirekten Immunfluoreszenz (IIF)

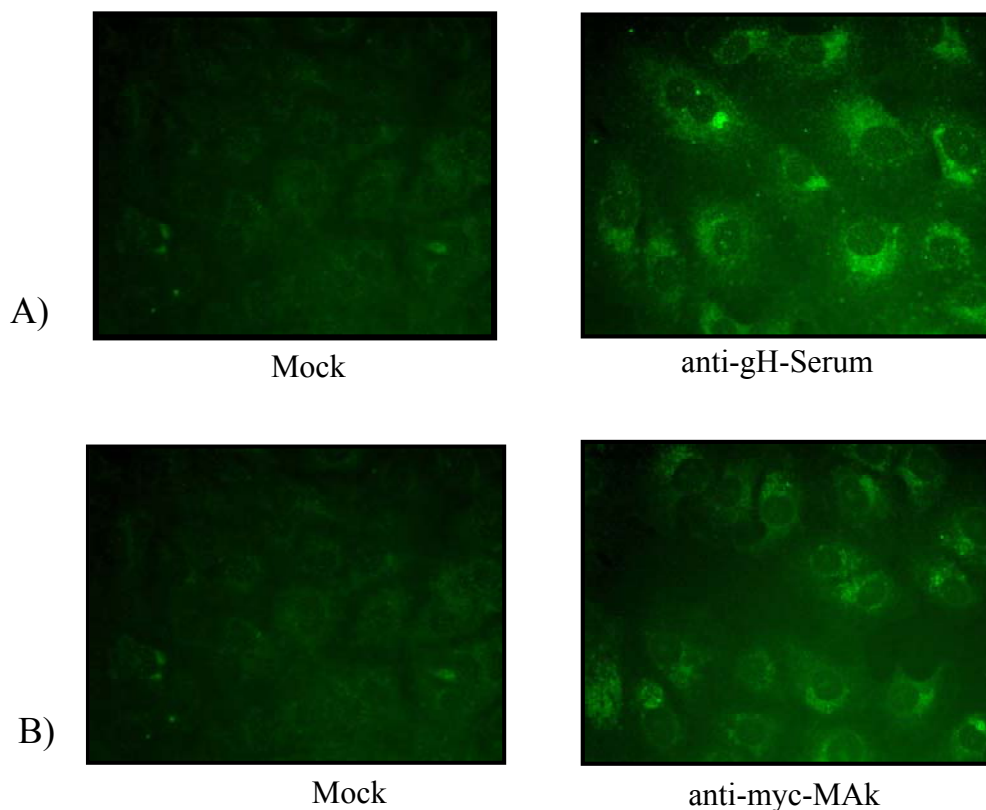
##### 4.4.1 Etablierung und Charakterisierung einer gH-exprimierenden Zelllinie

Um Informationen über die Funktion des gH bei EHV-4 zu erhalten, sollte das gH-kodierende Gen deletiert werden. Da Untersuchungen der gH-Homologe bei den anderen Herpesviren dem Protein eine essentielle Rolle für die Virus-Replikation *in vitro* zugeschrieben haben, schien es angebracht, eine Zelllinie, die das zu deletierende Protein *in trans* zur Verfügung stellt, zu etablieren. Dazu wurden Vero-Zellen mit den rekombinanten Plasmiden pAmpgH oder pMycgH (4.1) transfiziert. Beide Plasmide tragen den gesamten ORF (2567 bp) des gH, der unter der Kontrolle des HCMV-IE-Promotors steht. In Folge der vom Promotor vermittelten kontinuierlichen Expression sollte das Fremdgen in gut nachweisbaren Mengen exprimiert werden. Die transfizierte Plasmid-DNA wird jedoch nicht repliziert. Um die Selektion der Integration eines fremden Gens ins Zellgenom zu erleichtern, wurde das

Konstrukt pAmpgH mit dem Plasmid pSV2-neo im Verhältnis 1:10 kotransfiziert. Letzteres Plasmid trägt das Aminoglykosid-3'-phosphotransferase-Gen, welches das Aminoglykosidantibiotikum Genitacin durch Phosphorylierung inaktiviert und somit eine Resistenz der Zellen gegen Zerstörung durch dieses Antibiotikum vermittelt.

Bei der Verwendung des pMycgH-Konstruktes war eine Kotransfektion mit dem Plasmid pSV2-neo nicht notwendig, da dieses bereits das Resistenz-Gen trägt. Durch Immunfluoreszenzfärbung mit dem anti-gH-Serum wurden die selektierten Zellklone auf die Expression des integrierten Fremdgens überprüft.

In der Zelllinie, die mit dem Konstrukt pMycgH hergestellt wurde, konnte eine deutliche gH-spezifische Fluoreszenz um die Nukleusmembran sowie ein schwächeres, granuläres, diffuses Signal im Zytoplasma beobachtet werden. Auf Grund dieses Verteilungsmusters wurde die Lokalisation des Proteins in Membranen, im Bereich des endoplasmatischen Retikulums bzw. des Golgi-Netzwerks vermutet (Abb. 17).



**Abbildung 17:** Die myc-gH-Zelllinie wurde in einer Immunfluoreszenzfärbung mit dem anti-gH-Serum sowie mit dem MAK  $\alpha$ -c-myc auf die Expression des Fremdgens untersucht. Mit beiden Antikörpern konnte ein spezifisches Signal im Bereich des endoplasmatischen Retikulums bzw. des Golgi-Netzwerks nachgewiesen werden. Um festzustellen, ob es sich um eine spezifische Fluoreszenz handelt, wurden Vero-Zellen mit den jeweiligen Antiseren gefärbt. (anti-gH-Serum 1:12000,  $\alpha$ -c-myc MAK 1:200,  $\alpha$ -rabbit-Alexa 1:8000,  $\alpha$ -mouse-Alexa 1:4000).

#### **4.3.2 Zelluläre Lokalisation des gH-Proteins in infizierten und transfizierten Zellen**

Um weitere Informationen über die intrazelluläre Lokalisation und evtl. über die Funktion des gH *in vitro* erhalten zu können, wurden EHV-4-infizierte Vero-Zellen nach unterschiedlichen Fixierungsmethoden in der IIF untersucht. Dazu wurden konfluente Vero-Zellen mit EHV-4 infiziert und nach 14 h entweder mit 80 % Aceton oder mit 2 % PFA fixiert (3.2.8.1.1 und 3.2.8.1.2). Die Fixierung mit Aceton, einem Lösungsmittel, das gleichzeitig die Zellwand permeabilisiert, ermöglicht, die intrazellulär lokalisierten Proteine nachzuweisen. Im Gegensatz dazu führt eine Fixierung mit PFA zu keiner Schädigung der Zellmembran und ermöglicht die Detektion von Proteinen auf der Zelloberfläche.

##### Vergleich der Lokalisation des gH in infizierten und transfizierten Zellen

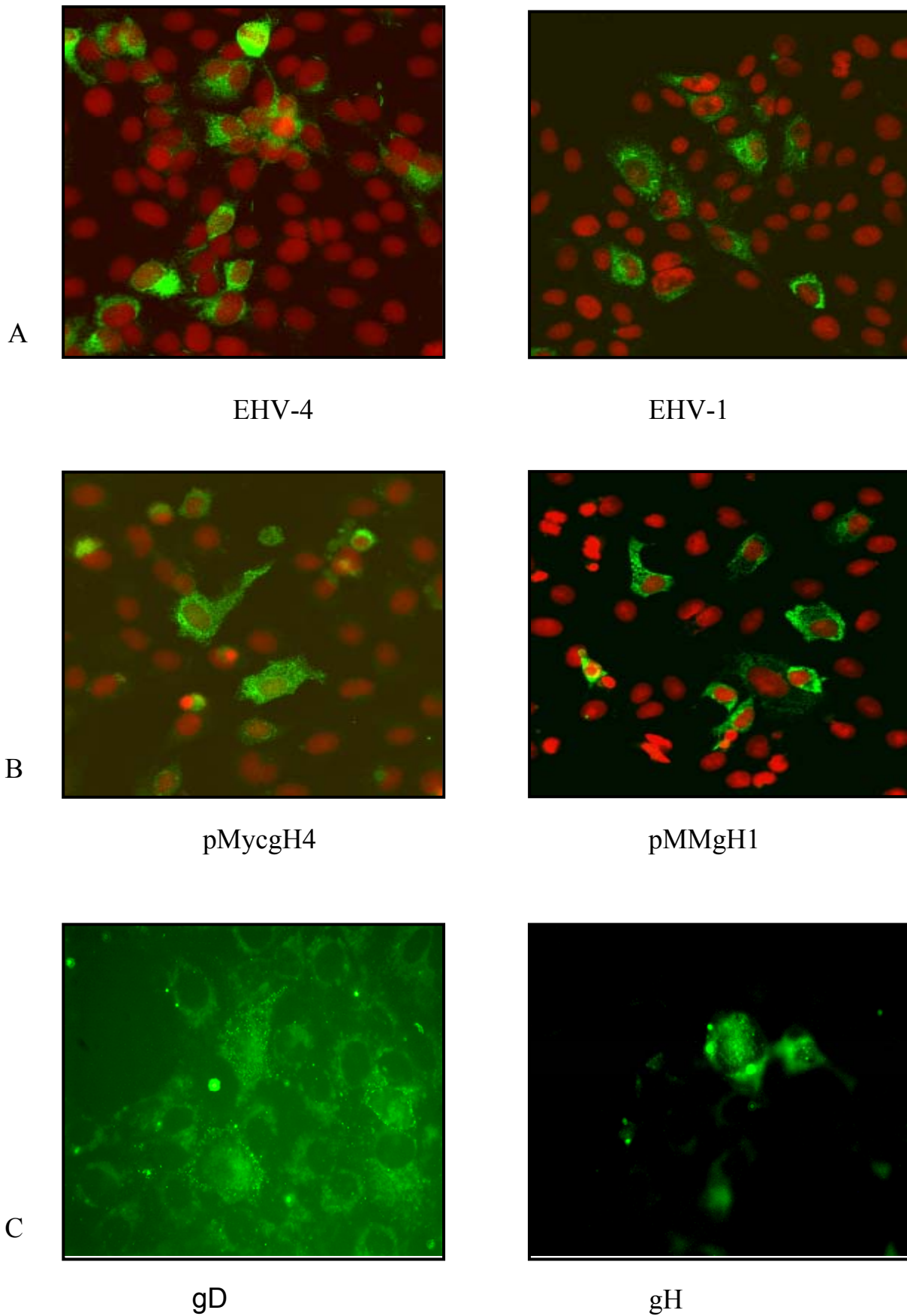
Die mit Aceton fixierten EHV-1- und EHV-4-infizierten Zellen wurden nach Immunfluoreszenz-Färbung mit anti-gHt-Serum mit einem konfokalen Laserscan-Mikroskop untersucht. Dabei konnte im ganzen Zytoplasma eine netzartige diffuse, gH-spezifische Fluoreszenz beobachtet werden (Abb. 18 A).

Zur Untersuchung des Verteilungsmusters von gH in Zellen, unabhängig von der Expression anderer viraler Proteine, wurden Vero-Zellen mit dem Plasmid pMycgH transfiziert und im Anschluss nach Aceton-Fixierung mit dem anti-gHt-Serum gefärbt. Im konfokalen Laserscan-Mikroskop konnte auch hier das gH, ähnlich wie in infizierten Zellen, netzartig diffus im Zytoplasma nachgewiesen werden (Abb. 18 B). Im Vergleich dazu war für die gH-exprimierende Zelllinie (4.3.1) ein etwas abweichendes Verteilungsmuster gefunden worden. Das beobachtete abweichende Verteilungsmuster kann jedoch auch auf ein schwächeres Signal zurückgeführt werden, da die Intensität eines Signals durch die unterschiedlichen verwendeten Antikörper oder durch die geringere Expression des Proteins in stabil exprimierenden Zellen beeinflusst wird.

##### Lokalisation von gH-Epitopen auf der äußeren Zellmembran

In Zellen, die mit PFA fixiert wurden, konnte nach Färbung mit dem anti-gH-Serum ein spezifisches Signal detektiert werden. Die Bindung der gH-spezifischen Antikörper an außerhalb der Zellmembran lokalisierten Epitopen ließ vermuten, dass das gH während der Infektion auf die Zelloberfläche transportiert wurde und dass es sich um ein Membranprotein

handelt (Abb. 18 C). Die Qualität der Fixierung wurde an Hand der Oberflächen-Expression von gD, einem bekannten Oberflächen-Protein, kontrolliert.



**Abbildung 18: A + B):** Zur Darstellung der intrazellulären Lokalisation des gH-Proteins wurden Vero-Zellen mit EHV-4 und EHV-1 infiziert (**A**) oder mit dem Plasmid pMycgH und pMMH transfiziert (**B**). Nach Immunfluoreszenz-Färbung der Aceton-fixierten Zellen mit dem anti-gHt-Serum erfolgt die Auswertung mit einem konfokalen Laserscan-Mikroskop.

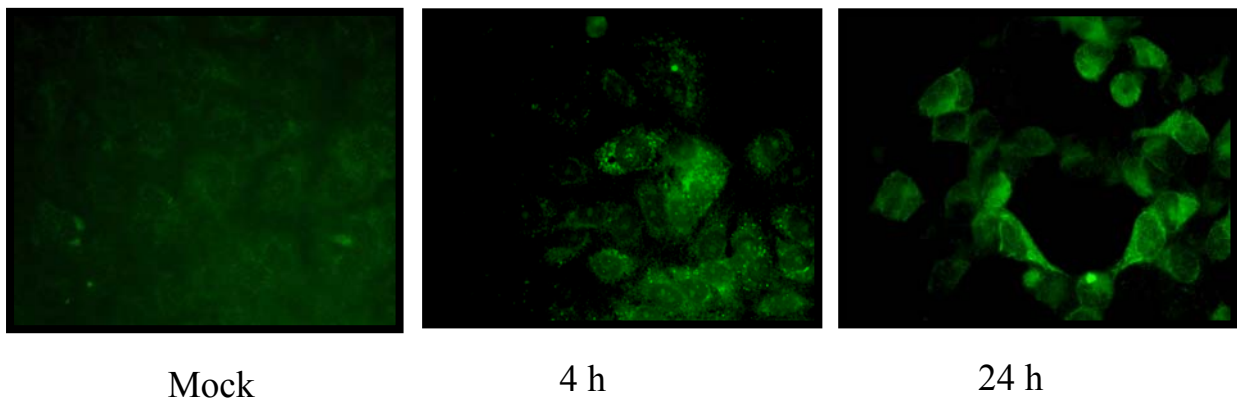
**C):** Zum Nachweis von auf der Zelloberfläche lokalisierten gH-Epitopen wurden Vero-Zellen mit EHV-4 infiziert und mit 2 % PFA fixiert. Nach Färbung mit dem anti-gH-Serum und dem anti-gD-MAk 20C4 erfolgte die Auswertung am Axioskop Fluoreszenzmikroskop. (anti-gH-Serum 1:12000, anti-gHt-Serum 1:2000, anti-gD-MAk 20C4 1:2000,  $\alpha$ -rabbit Alexa 1:8000,  $\alpha$ -mouse Alexa 1:2000).



#### 4.4.3 Expressionskinetik des gH-Proteins in der indirekten Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz ist es möglich, im Gegensatz zum Western Blot auch die Expression eines Proteins in wenigen Zellen zu detektieren.

Um den genaueren Zeitpunkt zu bestimmen, ab dem das gH in der EHV-4-Infektion synthetisiert wird, wurden Vero-Zellen mit EHV-4 mit einer MOI von 3 infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion mit 80 % Aceton fixiert. Nach Immunfluoreszenz-Färbung mit dem anti-gH-Serum konnte das gH-Protein als eine diffuse membrangebundene Fluoreszenz bereits ab 4 h nach der Infektion detektiert werden (Abb. 19).



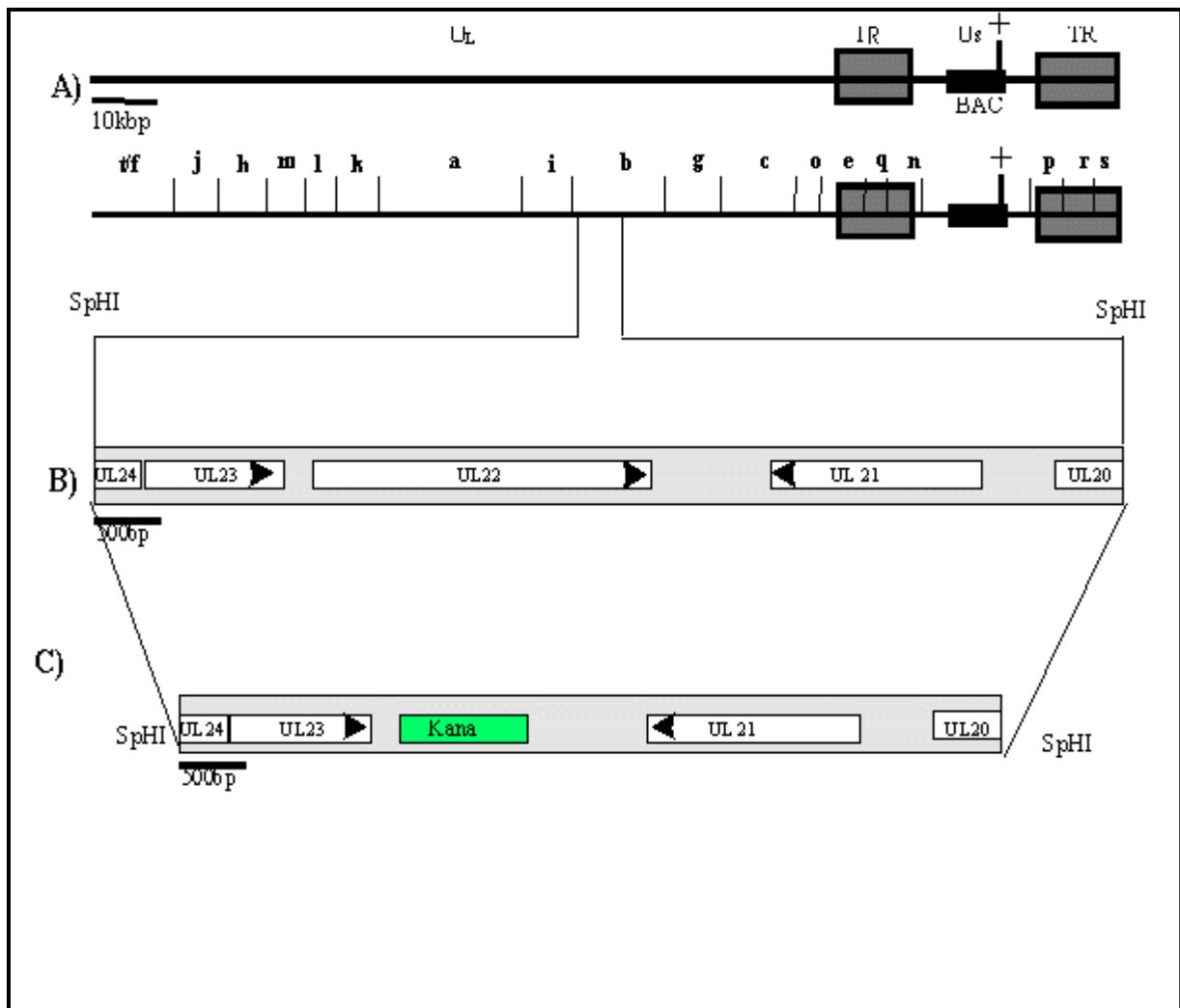
**Abbildung 19:** EHV-4-infizierte Vero-Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert. Anschließend wurde die Expression des gH mit Hilfe des anti-gH-Serums untersucht. Die Auswertung erfolgte am Axioskop-Mikroskop (Anti-gH-Serum 1:12000,  $\alpha$ -rabbit-Alexa 488 1:8000).

## 4.5 Konstruktion und Charakterisierung von Deletionsmutanten

### 4.5.1 Generierung eines EHV-1-gH negativen BAC, pRacL11ΔgH

Die Untersuchung eines viralen Proteins in eukaryotischen Zellen ermöglicht nur bestimmte Aussagen über die Expression und Struktur und gibt nur indirekt Hinweise auf die Funktion des Proteins während der Virusreplikation, im Zusammenspiel mit anderen viralen Faktoren. Durch die Herstellung einer Mutante dagegen kann die Funktion eines Genprodukts auch innerhalb des viralen Vermehrungszyklus untersucht werden. Dabei können entweder Insertionsmutanten oder Deletionsmutanten hergestellt werden. Während bei einer Insertionsmutante ein Gen durch Insertion eines Markergens unterbrochen wird, wird bei einer Deletionsmutante das Gen teilweise oder vollständig entfernt und meistens ebenfalls durch einen Selektionsmarker ersetzt. Eine Aufgabe dieser Arbeit war es, über die Generierung einer gH-negativen Deletionsmutante Informationen über die Funktion des Glykoprotein H von EHV-1 und EHV-4 zu erhalten. Im Laufe der Jahre sind unterschiedliche Methoden zur Generierung von Herpesvirus-Mutanten etabliert worden. Durch die Klonierung des gesamten Genoms von EHV-1 als infektiöses “*bacterial artificial chromosom*” (BAC) wurde die Herstellung von Virusmutanten durch Nutzung des bakteriellen Rekombinationsapparats erleichtert. Diese Strategie wurde zur Generierung des gH-negativen EHV-1 genutzt. Dazu wurde das Kanamycin-Resistenzgen aus dem Plasmid pACYC177 (Fa. Biolabs) durch eine Standard-PCR amplifiziert (s. 3.2.7.1). Zur Amplifikation der gH-Sequenz wurden die Primer (gh1dellow und gh1delforw) (s. Tab. 1) so ausgewählt, dass auch die flankierenden homologen Bereiche des gH-Gens angehängt wurden. Nach der Amplifizierung wurde das aufgereinigte Produkt mittels Elektroporation in den *E.-coli*-Stamm DH10B transferiert. Diese Bakterien eignen sich besonders für die BAC-Mutagenese, da ihnen wichtige Gene, die die recABCD-Rekombinations-Maschinerie bilden, fehlen. Aufgrund repetitiver Signalmotive innerhalb des herpesviralen Genoms würde dieser Komplex zu unerwünschten Rekombinationen führen. Die verwendeten Bakterien enthielten sowohl das als BAC klonierte Genom des Stamms RacL11, pRacL11, als auch das Plasmid pGETrec. Dieses Plasmid kodiert für die recE, eine 5'----> 3' Exonuklease, und für das recT, ein DNA-Einzelstrang-(ssDNA) bindendes Protein. Beide Gen-Produkte, auch als Rekombinase E/T bezeichnet, induzieren gemeinsam die Anlagerung, den Transport und die Invasion des DNA-Einzelstrangs. Dadurch wird die homologe Rekombination zwischen einem linearen DNA-Fragment und dem zirkulären herpesviralen Genom vermittelt. Durch

das durch die Rekombinase *recE/T* induzierte doppelte “*crossing-over*” kann das *gH*-Gen durch das Kanamycin-Resistenzgen ersetzt werden. Nach Inkubation (über Nacht) der transformierten Bakterien bei 37 °C auf Selektiv-Agarplatten wurde aus den gewachsenen Kolonien die extrachromosomale DNA isoliert (siehe 3.2.7.7.2) und in Agarosegel und Southern Blot untersucht. Der generierte *gH*-negative *pRacL11* erhielt die Bezeichnung *pRacL11ΔgH* (Abb. 20).



**Abbildung 20:** Schematische Darstellung der *gH*-Deletionsmutante: *pRacL11ΔgH*. Um die Lage des *SphI*-Fragments zu zeigen, das das *gH*-Gen enthält, ist in Zeile (A) die Genomorganisation von *pRacL11*- eingezeichnet. Die Buchstaben bezeichnen die Fragmente, die nach Spaltung mit der Restriktionsendonuklease *Bam*HI entstehen. Die grauen Kästchen entsprechen der Lokalisation der *IR*-Region und der Sequenz aus den Plasmid *pHA2*, die in das Gen 71 (*gp2*) inseriert worden war (Rudolph und Osterrieder, 2002). Zeile (B) zeigt das 7,7 kbp große *SphI*-Fragment, das die gesamten *UL21*- *UL22*-(*gH*) und *UL23*-Gene sowie Teile des *UL20*- und *UL24*-Gens enthält. Zeile (C) zeigt die Deletion des gesamten *gH*-Gens und die Insertion des Kanamycin-Resistenzgens (*kana*).

#### 4.5. 2 Charakterisierung des Genotyps von pRacL11ΔgH in Agarosegel und Southern Blot

Zum Nachweis der korrekten Insertion des Kanamycin-Resistenzgens an Stelle des gH-Gens wurde der Genotyp des mutierten pRacL11, pL11ΔgH, im Southern Blot untersucht und mit dem des unveränderten pRacL11 verglichen. Dazu wurde die DNA der entsprechenden BACs aus Bakterien isoliert und mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Eco*RI und *Hind*III verdaut. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente über ein 0,8 % Agarosegel wurde zunächst die DNA an Hand des Restriktionsenzym-Fragment-Musters im Agarose-Gel auf unerwünschte mögliche Veränderungen untersucht (Abb. 21). Danach erfolgte die Detektion spezifischer Sequenzen durch Hybridisierung mit einer gH-spezifischen Sonde und mit einer Kanamycin-spezifischen Sonde (3.2.6.3). Die gH-Sonde entspricht dem 7,7 kpb großen DNA-Fragment, das über einen *Sph*I-Restriktionsverdau aus dem Plasmid pgH1 entlassen wurde (s. 4.1). Als Kana-Sonde wurde das 970 bp durch PCR-amplifizierte Kanamycin-Resistenzgen aus dem Plasmid pACYC177 verwendet.

Mit der “gH”-Sonde wurden folgende Fragmente detektiert:

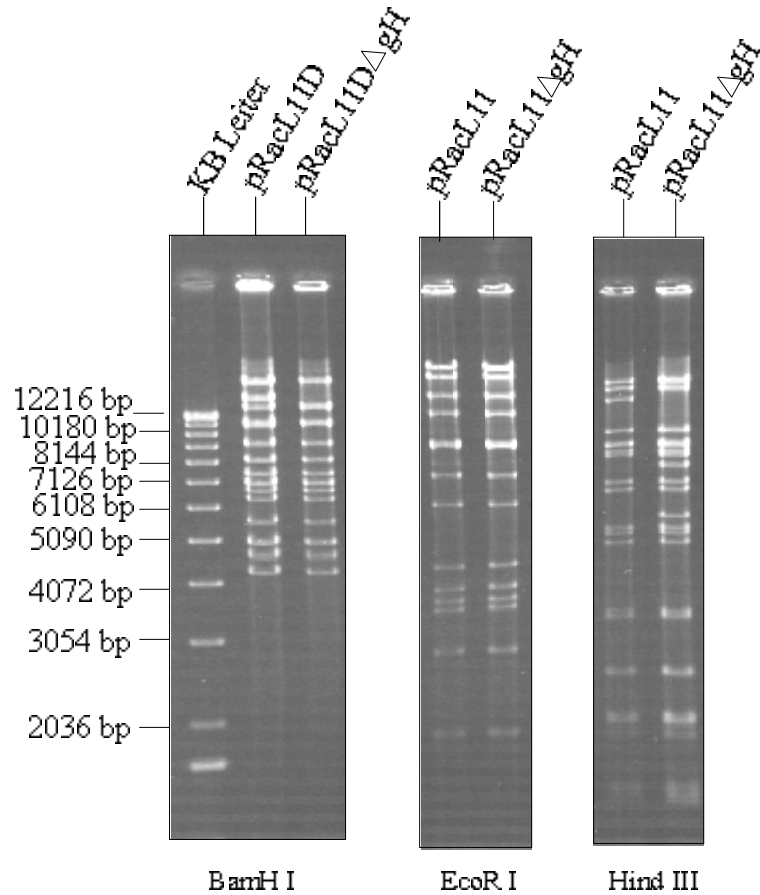
##### pRacL11

Im Falle des pRacL11 konnte nach *Bam*HI-Spaltung das 15.003 bp *Bam*HI-b-Fragment detektiert werden. Nach *Eco*RI- und *Hind*III-Spaltung wurden entsprechend 37.883 bp und 14.788 pb große Fragmente detektiert (Abb. 22).

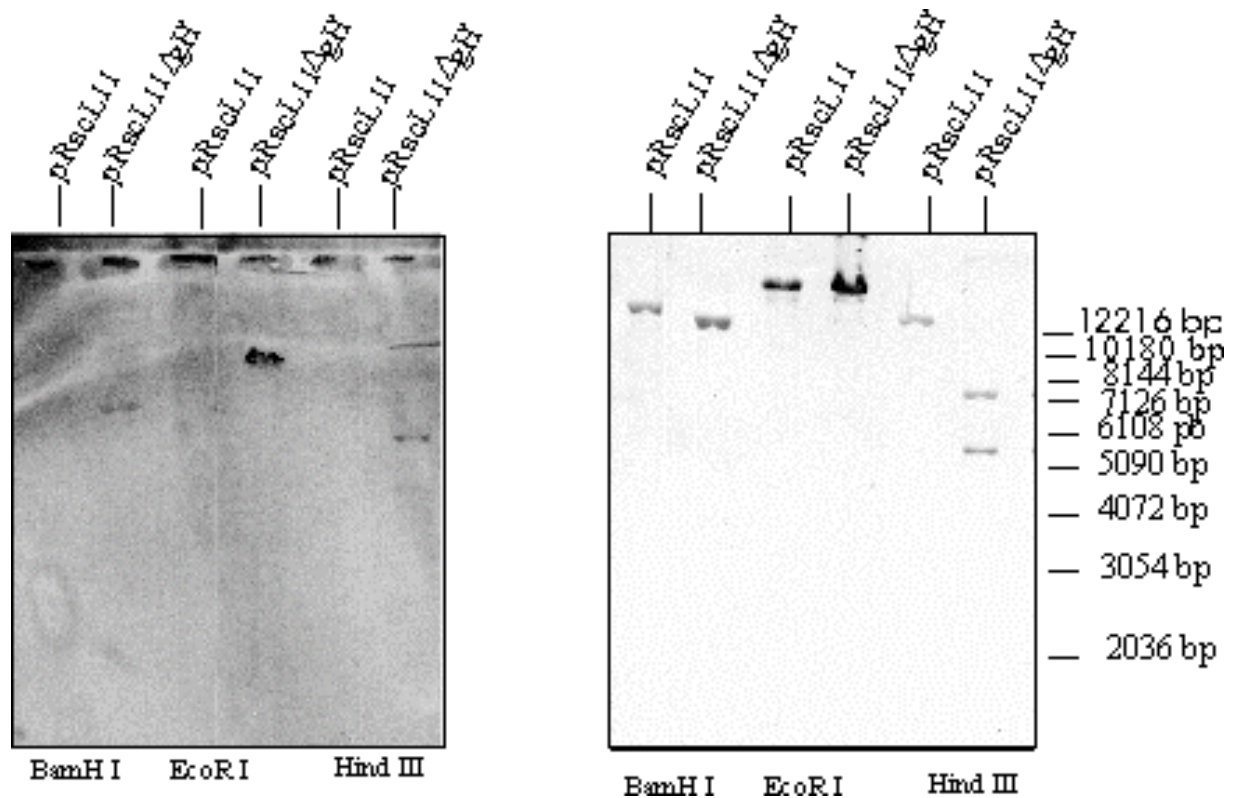
##### pRacL11ΔgH

DNA von pRacL11ΔgH hybridisierte mit der gH-spezifischen Sonde nach *Bam*HI- und *Eco*RI-Spaltung mit 13.457 bp bzw. 35.337 bp großen Fragmenten. Diese Fragmente entsprechen der Größe des *Bam*HI-b-Fragments, abzüglich der gesetzten Deletion im gH-Gen (2567 bp) und zuzüglich der Sequenzen des Kanamycin-Resistenz-Gens (ca. 970 bp). Nach *Hind*III-Spaltung wurden mit der gH-Sonde zwei Fragmente mit einer Größe von 5924 bp und 7313 bp nachgewiesen. Diese zwei Fragmente resultieren aus einer zusätzlichen *Hind*III-Schnittstelle, die durch Insertion des Kanamycin-Resistenz-Gens eingefügt wurde (Abb. 22).

Mit der Kana-Sonde konnten, wie erwartet, keine Fragmente bei pRacL11 nachgewiesen werden, jedoch wurden die entsprechenden Fragmente (s.o.) im pRacL11ΔgH, die zuvor auch mit der gH-spezifischen Sonde hybridisiert wurden, detektiert.



**Abbildung 21:** Die DNA-Fragmente wurden nach Verdau der pRacL11- und pRacL11ΔgH-DNA mit *Bam*HI, *Eco*RI und *Hind*III über ein 0,8 % Agarosegel aufgetrennt. Im Agarosegel konnten an Hand des DNA-Fragment-Musters keine Mutationen festgestellt werden.



**Abbildung 22:** Zum Nachweis der korrekten Insertion des Kanamycin-Resistenzgens wurde der Genotyp des rekombinanten pRacL11ΔgH im Southern Blot untersucht und mit dem des pRacL11 verglichen. Zur Hybridisierung dienen die gH-Sonde und die Kana-Sonde, die zuvor mit Dioxigenin markiert worden waren. Die Detektion erfolgte durch das Chemolumineszenz-Substrat CSPD. Die Bandengrößen des DNA-Standards sind in bp angegeben.

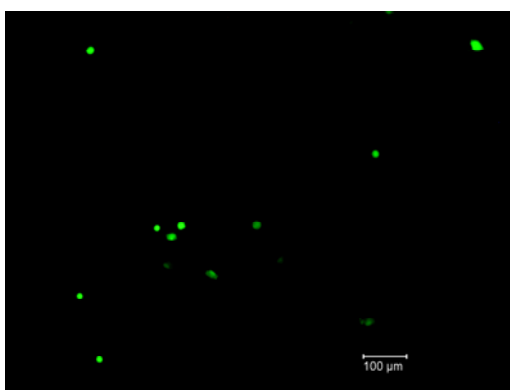
#### 4.5.3 Das EHV-1-gH-Protein ist essentiell für die Virus-Replikation *in vitro*

Um die Funktion bzw. Bedeutung des EHV-1-gHs für die Replikation zu untersuchen, sollte infektiöses Virus nach Transfektion von BAC-DNA in Rk13-Zellen rekonstituiert werden. Dazu wurde in einem parallelen Ansatz Rk13-Zellen mit DNA von pRacL11ΔgH und mit pRacL11 transfiziert (3.2.3.1). Die Zellen wurden nach der Transfektion bei 37 °C inkubiert und auf das Auftreten von Virus-Plaques untersucht. In Folge der in das virale Genom inserierten Sequenzen aus dem Plasmid pHA2, die unter anderem für das “*green-fluorescent-protein*” (GFP) kodieren, konnten entstandene Plaques bzw. infektiöse Foci an Hand ihrer Autofluoreszenz am Axioskop ausgewertet und fotografisch dokumentiert werden.

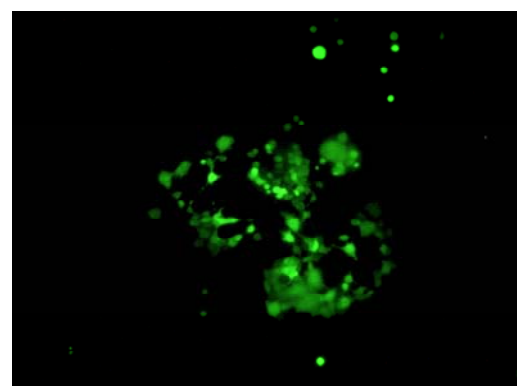
Nach Transfektion der pRacL11ΔgH-DNA in nicht komplementierende Rk13-Zellen wurden am Axioskop nur einzelne Zellen, die eine GFP Fluoreszenz zeigten, nachgewiesen. Im Gegensatz dazu führte die Transfektion der pRacL11-DNA zur Ausbildung von fluoreszierenden Virusplaques (Abb. 23).

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die rekominante pRacL11ΔgH-DNA mit dem Plasmid pgH1, das das vollständige gH-Gen mit zusätzlichen homologen Sequenzen enthält, (4.1) kotransfiziert. Dabei konnte infektiöses Virus rekonstituiert werden. Die entstandenen Plaques zeigten, im Vergleich zu den pRacL11 ausgebildeten Plaques, keine sichtbaren Unterschiede (Abb. 23).

Die Tatsache, dass ausschließlich eine Kontrasfektion der gH-negativen BAC-DNA mit dem Rekombinationsplasmid pgH1 zur Restaurierung von infektiösem Virus führt, weist darauf hin, dass das EHV-1-gH für die Virus-Replikation *in vitro* essentiell ist.



pL11ΔgH



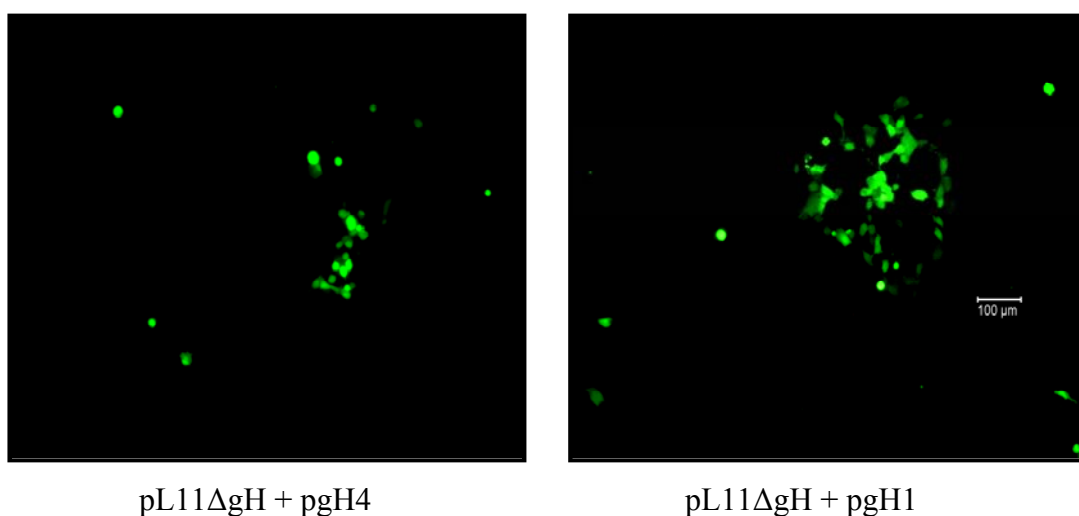
pRacL11

**Abbildung 23:** Zum Nachweis, dass das EHV-1-gH für die Virus-Replikation essentiell ist, wurden Rk13-Zellen mit dem pRacL11ΔgH-DNA transfiziert bzw. mit dem Plasmid pgH1 kotransfiziert. Die entstanden infektiösen Foci bzw. Plaques wurden am Axioskop-Mikroskop ausgewertet und dokumentiert.

#### 4.5.4 EHV-1- und EHV-4-gH-Proteine sind funktionell nicht austauschbar

Nach Etablierung der EHV-4-gH-exprimierenden Zelllinie war es von Interesse, inwieweit diese in der Lage ist, für das fehlende gH eines gH-negativen EHV-1 zu komplementieren. Ein geeigneter Parameter für den Komplementierungsgrad der Zelllinie ist die Plaquebildung. Da die Homologie der Aminosäuresequenzen zwischen EHV-1- und EHV-4-gH-Proteinen relativ hoch ist (85,7 %), wurde eine Komplementierung des EHV-4-gH für die Deletion des gH aus EHV-1 erwartet. Nachdem die Transfektion der EHV-4-gH-Zelllinie mit dem gH-negativen EHV-1-BAC zu keiner Plaquebildung führte (nicht gezeigt), wurde ein möglicher funktioneller Unterschied zwischen den zwei gH-Proteinen vermutet. Um dies näher zu untersuchen, wurden Kotransfektionsversuche in RK13-Zellen mit den Plasmiden pgH1 und pgH4 und der pRacL11ΔgH-DNA durchgeführt.

Die Plaques, die nach Kotransfektion des Plasmids pgH1 mit gH-negativen EHV-1-BAC entstanden waren, wiesen tatsächlich keinen sichtbaren Unterschied im Vergleich zu den Plaques der nach Transfektion von pRacL11-DNA rekonstituierten Viren, pRacL11, auf. Bei der Kotransfektion des Plasmids pgH4 mit pRacL11ΔgH -DNA wurden nur Plaques beobachtet, die sehr wenige infizierte Zellen enthielten und entweder keinen oder nur einen deutlich kleineren Bereich vollständiger Zell-Lyse zeigten (Abb. 24). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass EHV-1- und EHV-4-gH-Proteine funktionell nicht identisch und austauschbar sind.



**Abbildung 24:** Die Virus-Plaques nach Kotransfektion des Plasmids pgH4 mit gH-negativen EHV-1-BAC (pgH4 + pRacL11ΔgH) bestanden aus wenigen infizierten Zellen, während die durch die Kotransfektion mit dem Plasmid pgH1 (pgH1 + pRacL11ΔgH) entstanden Plaques, im Vergleich zur Transfektion von pRacL11, keinen deutlichen Unterschied zeigten.



## 5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die vergleichende strukturelle und funktionelle Charakterisierung des Glykoprotein H von EHV-1 und EHV-4. Dazu wurde das gH in infizierten und transfizierten Zellen identifiziert und seine Eigenschaften hinsichtlich posttranslationaler Modifikationen und intrazellulärer Lokalisation in Western Blot und Immunfluoreszenz analysiert. Trotz der hohen Homologie der Genom-Sequenzen weisen EHV-1 und EHV-4 erhebliche biologische Unterschiede auf, deren Mechanismen noch weitestgehend unverstanden sind. Um diese Unterschiede nachzuvollziehen, ist es notwendig, die beiden Viren zu vergleichen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, durch die Herstellung einer gH-negativen Virusmutante erste Informationen über die Funktion des gH im Replikationszyklus zu gewinnen. Dabei sollte geklärt werden, ob das Protein essentiell für die Infektiosität ist, und ob es am *“cell-to-cell-spread”* beteiligt ist. Außerdem sollen die Homologe von EHV-1 und EHV-4 an Hand ihrer Funktion verglichen werden.

### 5.1 Das gH-Protein bei EHV-4

Da das zur Immunisierung eines Kaninchens eingesetzte EHV-4-Polypeptid eine hohe Sequenzidentität zu EHV-1 aufwies, konnte mittels des erzeugten Antiserums das jeweilige gH-Homolog sowohl in mit EHV-4 als auch EHV-1 infizierten Zellen und in aufgereinigten Virionen nachgewiesen werden. Das Serum zeigte jedoch eine schwächere Reaktivität im Western Blot mit dem gH von EHV-1. Dies ist vermutlich auf die nicht 100%ige Homologie der Aminosäuresequenzen zurückzuführen. Das Antiserum detektierte in EHV-4-infizierten Zelllysaten zwei spezifische Proteine mit apparentem Molekulargewicht von 130 und 140 kDa. In Virionen konnte nur die 140 kDa große Bande nachgewiesen werden. Die beobachteten Abweichungen weisen auf ko- und post-translationale Modifikationen hin. Durch eine computergestützte Aminosäuresequenz-Analyse wurden in der gH-Sequenz elf Konsensussequenzen für eine potentielle N-Glykosylierung identifiziert. Um diese potentiellen Modifikationen genauer zu analysieren, wurden aufgereinigte Virionen mit den Enzymen N-Glykosidase F und Endoglykosidase H behandelt. Dadurch wird eine Unterscheidung zwischen reifen und unvollständig prozessierten Formen des Proteins möglich. Die Behandlung mit N-Glykosidase F führte zu einer Erhöhung der elektrophoretischen Mobilität des gH von 140 auf 95 kDa. Diese Bande stellt somit das

unglykosilierte Proteingerüst dar und stimmt mit dem vorausberechneten Molekulargewicht des primären Translationsprodukts weitestgehend überein. Der Verdau mit der Endoglykosidase H führte zu einer Reduktion des Molekulargewichts von 140 auf 130 kDa. Das 95 kDa große Verläufer-Protein wird offenbar ko- und posttranslational durch Bindung von N-gebundenen Oligosacchariden modifiziert. Die im Zelllysate beobachtete 130 kDa große Proteinbande könnte die unvollständig prozessierte Form des gH darstellen. Solche Formen entstehen während kotranslationaler Prozessierung im Lumen des rER durch Anfügen eines zentralen Oligosaccharids aus 14 Resten vom „*High-Mannose-Typ*“, welche unreif und Endoglykosidase-H-sensitiv sind. Nicht auszuschließen ist jedoch auch die Möglichkeit, dass es sich bei der beobachteten 140 kDa Form des gH um eine, beim Einbau des Proteins in die Virionen durch Konformationsänderung resultierende, in ihrer elektrophoretischen Mobilität veränderte Form handelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur Virionen auf eine potentielle Modifikation durch N-Glykosylierung untersucht. Es wird davon ausgegangen, dass in der Virushülle nur ein vollständig prozessiertes Protein eingebaut wird und theoretisch keine Endoglykosidase-H-sensitiven Zuckerreste vorhanden sein sollten. Jedoch kann es auf Grund der tertiären und quartären Protein-Strukturen oder auch durch Interaktion mit anderen viralen Proteinen zu einer verminderten Zugänglichkeit und daraus resultierend zu einer unvollständigen posttranslationalen Prozessierung der Zuckerreste führen. Dann sind auch Endoglykosidase H sensitive Zuckerreste in Virionen zu erwarten. Neben der N-Glykosylierung könnte eine Molekulargewichtserhöhung auch auf eine Modifizierung durch O-Glykosylierung zurückgeführt werden. Diese Modifizierung erschien jedoch unwahrscheinlich, einerseits weil nur selten herpesvirale Glykoproteine durch O-Glykosylierung im Golgi-Apparat modifiziert werden, und andererseits weil die Größe des Genprodukts mit der errechneten Größe übereinstimmt. Untersuchungen zur O-Glykosylierung wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, somit kann eine Modifikation dieser Art nicht völlig ausgeschlossen werden.

Entsprechend der zeitlichen Expression werden die alphaherpesviralen Proteine in drei Gruppen gegliedert:  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\gamma$ -Proteine (siehe 2.4.1). Die  $\gamma$ -Proteine werden nochmals in  $\gamma_1$ - und die  $\gamma_2$ -Proteine unterteilt, deren Expression vom Ausmaß der viralen DNA-Synthese abhängt. Das gH von EHV-4 wurde, im Gegensatz zu seinem HSV-1 Homolog, zu den „*early-late*“ ( $\gamma_1$ )-Proteinen gezählt, da auch nach einer vollständigen Hemmung der DNA-Synthese die Expression des Proteins nachweisbar blieb. Im Verlauf einer EHV-4-Infektion war sowohl eine gH- als auch eine gB-spezifische Reaktion im Western Blot frühestens 12 h

p.i. zu erkennen, hingegen wurden bei einer EHV-1-Infektion die beiden Proteine (gH und gB) erstmals 5 h nach der Infektion nachgewiesen. Frühere Studien haben gezeigt, dass das gB ein “*early-late*” Protein ist. Folglich lassen die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen darauf schließen, dass sowohl gH als auch gB in die gleiche Protein-Klasse einzugliedern sind. Die beobachteten unterschiedlichen Expressionszeitpunkte weisen darauf hin, dass EHV-4 in Vero-Zellen, im Gegensatz zu EHV-1 in RK13-Zellen, nicht optimal repliziert.

Proteine können mit anderen Proteinen über Disulfidbrücken oder andere kovalente Wechselwirkungen Komplexe eingehen. Dabei können homo- oder hetero-oligomere Komplexe gebildet werden. Um diese Frage zu beantworten, wurden aufgereinigte EHV-1- und EHV-4-Virionen in nicht-reduzierendem Probenpuffer aufgenommen und die sowohl bei 99 °C als auch bei 4 °C behandelten Proben im Western Blot untersucht. Dabei konnte eine zusätzliche Bande von über 250 kDa detektiert werden. Die Größe der beobachteten Bande konnte nicht mit Sicherheit zugeordnet werden, da in diesem Bereich eine Größenbestimmung, auf Grund der geringeren Auftrennungsfähigkeit des Gels, sehr ungenau ist. An Hand der verringerten elektrophoretischen Mobilität wurde jedoch deutlich, dass die gH-Homologe beider Viren Komplexe über Disulfidbrücken bilden. Dabei kann es sich entweder um homodimere-, heterodimere-, homo- oder hetero-Oligomere-Komplexe handeln. Die Bildung eines Heterodimers würde zwar mit der Tatsache korrelieren, dass bei den bisher untersuchten Herpesviren das gH mit dem gL einen Komplex bildet (Gompels und Minson 1989; Klupp *et al.*, 1994; Khattar *et al.*, 1996), dies scheint jedoch unwahrscheinlich, da die beobachtete Größe im Western Blot die Größe eines Heterodimers überschreitet. Da keine anti-gL-Antikörper zu Verfügung standen, konnte im Rahmen dieser Arbeit die genaue Zusammensetzung der Oligomeren-Komplexe nicht weiter untersucht werden.

Die zelluläre Lokalisation des gH von EHV-1 und EHV-4 wurde in infizierten und transfizierten Zellen mit Hilfe der erzeugten anti-gH-Seren in der Immunfluoreszenz untersucht. Dabei konnte die mögliche unterschiedliche Verteilung des Proteins in der Zelle mit und ohne viralen Hintergrund analysiert werden. Nach Infektion und Transfektion konnte eine netzartige diffuse gH-spezifische Fluoreszenz im ganzen Zytoplasma nachgewiesen werden. Vor allem in transient transfizierten Zellen konnte eine deutliche gH-spezifische Reaktion auch um die Nukleusmembran herum detektiert werden, was auf eine Lokalisation des Proteins im Bereich des Golgi-Apparats vermuten ließ. In der stabil exprimierenden

gH-Zelllinie war dagegen eine deutlichere Lokalisation des Proteins, assoziiert mit Membranen, im Bereich der Nukleusmembran, zu erkennen. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen intrazellulären Verteilungsmuster in den transient zu den stabil exprimierenden Zellen, wäre z.B. eine geringere Expression des Proteins in der Zelllinie und unterschiedliche verwendete Antikörper. Die beiden Systeme sind jedoch nicht direkt vergleichbar, da die Expressions-Bedingungen unterschiedlich sind. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass, bei der Expression des Fusionsproteins, das myc-Epitop einen Einfluss auf die Verteilung des gH-Proteins in der Zelle hat. Eine weitere Möglichkeit für eine abweichende Lokalisation des gH in transfizierten Zellen im Vergleich zu infizierten Zellen könnte eine unvollständige Ausprozessierung des Proteins sein. Bei HSV-1 wurde bereits nachgewiesen, dass das gH, in Abwesenheit von gL, unvollständig prozessiert wird, was zu einem fehlerhaften Transport des Proteins auf die Plasmamembran und zur intrazellulären Retention im ER führt (Foa-Tomasi *et al.*, 1991).

Prinzipiell werden je nach Präsenz und Position der Signal-Sequenz und der Transmembranregion innerhalb der Polypeptidkette, drei Arten von Membranproteinen unterschieden. Das Typ-I-Membranprotein weist die Aminosäuresequenz einer Transmembran-Domäne auf, die zwischen einer N-terminalen und einer C-terminalen Region eingelagert ist. Der N-Terminus befindet sich im Lumen des ER, während die C-terminale Domäne dem Zytoplasma zugewandt bleibt. Bei einem Typ-II-Protein hingegen befindet sich das C-terminale Ende im ER, während der N-Terminus dem Zytoplasma zugewandt bleibt. Proteine der Klasse III besitzen mehrere Transmembran-Domänen, die die Membran mehrmals durchqueren, jedoch fehlt eine hydrophobe Signalsequenz, die den Eintritt des Proteins in die Membran vermittelt. Die Vorhersagen an Hand des Hydrophylizitätsblots der Aminosäuresequenz des gH von EHV-4 ergaben, dass das gH den typischen Aufbau eines Membranproteins zeigt. Dabei wurde vorhergesagt, dass das Protein aus einer hydrophoben N-terminalen Signalsequenz (die ersten 19 AS), einer großen hydrophilen extrazellulären Domäne (AS 20-816), einer stark hydrophoben transmembranen Domäne (AS 817-836) und einer hochgeladenen intrazytoplasmatischen C-terminalen Domäne (AS 837-855) besteht (Nicolson *et al.*, 1990). Da mehrere putative Transmembran-Domänen fehlen, kann es sich bei dem gH nur um ein Typ-I- oder Typ-II-Membranprotein handeln. Um diese Frage zu beantworten, wurden unterschiedliche Experimente durchgeführt. In aufgereinigten Viruspartikeln wurde das gH, nach Inkubation mit Triton X-100 und darauf folgender Auftrennung in eine Hüll- und eine Kapsid-Fraktion, ausschließlich in der Virion-Hülle

nachgewiesen. Da die Virion-Hülle aus Knospung der zellulären Membran entsteht, muss es sich bei dem gH um ein Membran-assoziiertes Protein handeln. Zur Ermittlung der subzellulären Lokalisation des gH wurden infizierte Zellen mit Hilfe der generierten Antiseren in der Immunfluoreszenz auf außerhalb der Zellmembran lokalisierte Epitopen untersucht. Dabei wurde eine gH-spezifische Fluoreszenz auf der Zellmembran nachgewiesen. Auf Grund dieser Lokalisation lässt sich vermuten, dass das gH während der Infektion auf die Zelloberfläche transportiert wird. Außerdem kann an Hand der bewiesenen Glykosylierung vermutet werden, dass es sich bei dem gH um ein Typ-I-Membranprotein handelt. Bereits bei HSV-1 wurde im Verlauf einer Infektion das gH auf der Zelloberfläche nachgewiesen (Fao-Tomasi *et al.*, 1991). Diese Tatsache korreliert gut mit den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse.

## **5.2 Bedeutung des gH-Gens für die Virusreplikation *in vitro***

Um die Funktion des gH-Gens innerhalb des viralen Vermehrungszyklus zu untersuchen, sollte eine gH-negative EHV-1-Virusmutante mit Hilfe der BAC-Mutagenese generiert werden. Dazu wurde der gesamte gH-Leserahmen im pRacL11, einem BAC vom EHV-1-Stamm RacL11, durch das Kanamycin-Resistenzgen aus dem Plasmid pACYC177 ersetzt (pRacL11ΔgH). Nach Transfektion der mutierten BAC-DNA in Zellen sollten infektiöse Viren rekonstituiert werden. Die Transfektion der pRacL11ΔgH-DNA in nicht komplementierende Zellen führte jedoch, im Vergleich zur Transfektion von pRacL11, zu keiner Plaque-Bildung, sondern lediglich zu einzelnen Zellen, die eine GFP-spezifische Fluoreszenz zeigten. Aus der beobachteten Fluoreszenz konnte man nur schließen, dass die DNA erfolgreich in die Zelle gelangt ist und dass der HCMV-EI-Promotor angeregt wurde. Das Ausbleiben der Plaque-Bildung könnte auf die zusätzliche Deletion des gp2 zurückgeführt werden. Diese Vermutung steht jedoch im Widerspruch zu der Tatsache, dass nach Transfektion der pRacL11-DNA, auch ohne gp2-Expression, Plaques beobachtet werden konnten und dass gp2, wie frühere Untersuchungen gezeigt haben, nicht essentiell für die Replikation *in vitro* ist (Rudolph und Osterrieder., 2002). Auf Grund dieser Tatsachen kann vermutet werden, dass das gH eine wichtige Rolle für die Vermehrung von EHV-1 in Zellkulturen spielt. Eine Aussage über die genauere Funktion des gH-Produkts kann an Hand dieser ersten Untersuchungen nicht gemacht werden. Auf Grund von Untersuchungen des gH bei anderen Alphaherpesviren und von im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten

Experimenten kann jedoch über mögliche Funktionen des Glykoprotein H bei EHV-1 spekuliert werden. Bei der Transfektion entfallen die ersten Schritte des viralen Replikationszyklus (Adsorption, Penetration, Transport der DNA im Zellkern), da die DNA direkt in die Zellen einschleust wird. Da nach Transfektion der gH-negativen BAC keine Plaques zu beobachten waren und in folge der Tatsache, dass das gH von EHV-1 und EHV-4 spät im Replikationszyklus exprimiert wird, könnte das Protein am "*cell-to-cell-spread*" beteiligt sein.

Da auch nach mehrmaligen Passagierungen keine Infektiosität im Überstand beobachtet werden konnte, wäre es möglich, dass die Deletion des gH zu einer Retention der Nachkommenviren in den Zellen führt. Dies würde für eine Beteiligung des Proteins am "*egress*" sprechen. Außerdem wäre die Bildung von nicht infektiösen Viruspopulationen möglich. Nach bisherigen Erkenntnissen wird die Penetration des Virus in die Zelle über die Strukturproteine, die in der Virushülle lokalisiert sind, vermittelt. Da es sich bei dem gH um ein Strukturprotein handelt, wäre auch eine Beteiligung an den Penetrationsvorgängen möglich.

Da nach Transfektion von pRacL11ΔgH-DNA in die etablierte EHV-4-gH-exprimierende Zelllinie keine infektiösen Viren rekonstituiert werden konnten, stellte sich die Frage nach dem möglichen funktionellen Unterschied zwischen den gH-Homologen der beiden Viren EHV-1 und EHV-4. Dazu wurde die BAC-DNA mit den Rekombinationsplasmiden, die entweder gH von EHV-1 oder von EHV-4 exprimieren, kotransfiziert. Nach Kotransfektion des gH von EHV-1 konnten Plaques, die keine Unterschiede zu den Wildtypvirus-Plaques aufwiesen, festgestellt werden. Im Gegensatz dazu führte die Kontransfektion des gH von EHV-4 zur Bildung von Plaques, die nur sehr wenige infizierte Zellen enthielten. Diese Trans-Komplementierungs-Versuche deuten darauf hin, dass das gH von EHV-4 funktionell nicht vollständig das gH von EHV-1 komplementiert. Es ist bekannt, dass schon der Austausch einer einzigen Aminosäure zu einer erheblichen Veränderung der terziären Struktur eines Proteins führen kann. Eine solche Veränderung kann z.B. die Funktion des Proteins oder auch die Bindung an andere Proteine beeinflussen. Obwohl das gH von EHV-1 und EHV-4 eine sehr ähnliche Primärstruktur aufweisen, kann jedoch keine Vorhersage über die räumliche Struktur gemacht werden. Eine Punktmutation könnte auch die Interaktion des gH mit anderen viralen Proteinen, wie dem gL, verhindern. Sie könnte einerseits dann die Funktion des gH beeinträchtigen, die dann eigentlich gleich einzuordnen wäre, aber im fremden viralen Umfeld nicht voll ausgeübt werden könnte. Es bleibt festzuhalten, dass trotz

hoher Homologie der Aminosäuresequenzen das EHV-4-gH das EHV-1-gH nicht vollständig ersetzen kann, wodurch wiederum unterstrichen wird, wie kompliziert und wichtig die Vorgänge sind, an denen das gH mitwirkt.

## 6 Zusammenfassung / Summary

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das noch sehr wenig untersuchte Glykoprotein H von EHV-1 und EHV-4 zu charakterisieren und seine Bedeutung für die Virus-Replikation dieser Viren *in vitro* zu vergleichen.

Zur vergleichenden Untersuchung der gH-Homologe von EHV-1 und EHV-4 wurde für die Erzeugung eines polyklonalen Antiserums ein EHV-4-gH-Polypeptid eingesetzt, das eine hohe Sequenzhomologie zu EHV-1 aufwies. Das erzeugte Antiserum detektierte in Lysaten von EHV-4-infizierten Vero-Zellen zwei Proteinbanden mit apparentem Molekulargewicht von 130 und 140 kDa. Das gewonnene Serum reagierte mit gereinigten EHV-1- wie EHV-4-Virionen nur mit der 140 kDa großen Proteinbande. Das gH von EHV-4 wurde weiter charakterisiert, dabei konnte es frühestens ab 12 h nachgewiesen werden und die Expression konnte nach Inkubation mit Phosphonoessigsäure (PAA) nicht vollständig unterdrückt werden. Das Protein wurde daher als “*early-late*”-Protein klassifiziert.

Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation ergaben, dass das gH mit Membranen assoziiert ist. In gereinigten Viruspartikeln wurde das gH, nach Inkubation mit Triton X-100 und darauf folgender Auftrennung in eine Hüll- und eine Kapsid-Fraktion, ausschließlich in der Virion-Hülle nachgewiesen. Die Behandlung der aufgereinigten EHV-4-Virionen mit N-glykosidase F und Endoglykosidase H führte zu einer erheblichen Veränderung der elektrophoretischen Mobilität des gH. Das beweist, dass das Protein ko- und posttranslational durch N-Glykosylierung modifiziert ist. Die elektrophoretische Auftrennung unter nicht-denaturierenden Bedingungen erbrachte Anhaltspunkte für eine durch Disulfidbrücken vermittelte Komplexbildung des gH mit sich selbst oder mit anderen viralen Proteinen. EHV-1- und EHV-4-infizierte und mit den jeweiligen gH-Expressions-Plasmiden transfizierte Zellen zeigten in der Immunfluoreszenz eine deutliche gH-spezifische Fluoreszenz im Bereich des ER. In infizierten Zellen konnte außerdem das gH auf der Zellmembran nachgewiesen werden.

Durch Insertion eines Kanamycin-Resistenzgens und Deletion des gesamten gH-Leserahmens sollte mit Hilfe der BAC-Mutagenese ein gH-negatives EHV-1 generiert werden. Nach Transfektion der BAC-DNA in nicht-komplementierenden Zellen konnten keine infektiösen Viren rekonstituiert werden, was zeigt, dass das gH eine wichtige Rolle in der Virus-Replikation *in vitro* spielt. Die Kotransfektion der gH-negativen BAC-DNA mit einem Plasmid, das das EHV-4-gH exprimiert, führte zur Ausbildung von Plaques, die nur sehr



wenige infizierte Zellen enthielten. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass das gH von EHV-1 funktionell nicht durch das gH von EHV-4 ersetzt werden kann.

## 6 Summary

### **Comparative Analysis of the Structure and Function of the Glycoprotein H Homologs of Equine Herpesvirus Type 1 and Type 4**

The object of this study was to identify, analyse and compare the glycoprotein H (gH) homologs of equine herpesvirus type 1 and type 4 (EHV-1 and EHV-4). In a first step an anti gH serum was generated, directed against an EHV-4 gH polypeptid. To this aim a peptid of sequence was chosen that was highly homologous between the two viruses. In lysates of EHV-4 infected cells the obtained anti gH serum detected two specific protein bands with apparent molecular weights of about 130 and 140 kDa. On purified EHV-1 and EHV-4 virions, however, only the 140 kDa form was detected. The EHV-4 gH was then further characterised. The protein could be first detected in infected cells at 12 h p.i.. After incubation with phosphonoacetid acid, the expression was not completely inhibited, classifying EHV-4 gH as an "early-late" protein. Experiments were undertaken to analyse the subcellular localisation of the protein, and gH was shown to be membrane associated. After treatment of purified EHV-4 virions with Triton x 100, gH was detected exclusively in a fraction, containing viral envelopes. The treatment of purified virions with N-Glycosidase F or Endoglycosidase H resulted in a considerable alteration of the electrophoretic mobility of EHV-4 gH. This indicated that gH is co- and posttranslational modified by N-glycosilation. Electrophoresis under non-denaturing conditions proofed the formation of a disulfide-linked complex of gH, either with itself or with other viral or cellular proteins. By confocal laser microscopy the respective EHV-4 and EHV-1 gH specific fluorescences was detected predominantly in a pattern reminiscent of cellular membranes. In addition in infected EHV-4 cells gH reactivity was detected on the cell surface membrane.

Using BAC mutagenesis the complete gH gene was replaced by a kanamycin resistance gene to construct a gH negative EHV-1. After transfection of recombinant BAC-DNA into non-complementing cells no infectious virus was reconstituted, indicating that the EHV-1 gH plays an important role in the virus replication cycle in vitro.

Whereas cotransfection of an EHV-1 gH expression plasmid with DNA of the gH negative EHV-1 BAC readily resulted in wildtype virus plaques, cotransfection with a plasmid expressing EHV-4 gH resulted in small foci of infection also. It was concluded thus that although EHV-1 and 4 gH appear to be structurally quite similar, EHV-4 gH was functionally not able to fully replace the EHV-1 homologue.

## 7 Literaturverzeichnis

- Allen, G.P. und Bryans J.T.** (1977a). Replication of Equine Herpesvirus Type 3: Kinetics of Infectious Particle Formation and Virus Nucleic Acid Synthesis. *J. Gen. Virol.* 34.3: 421-30.
- Allen, G.P.; O'Callaghan, D.J. und Randall, C.C.** (1977b). Genetic Relatedness of Equine Herpesvirus Types 1 and 3. *J. Virol.* 24.3: 761-67.
- Allen, G.P. und Bryans, J.T.** (1986). Molecular Epizootiology, Pathogenesis, and Prophylaxis of Equine Herpesvirus-1 Infections. *Prog. Vet. Microbiol. Immunol.* 2: 78-144.
- Allen, G.P. und Yeargan, M.R.** (1987). Use of Lambda gt11 and Monoclonal Antibodies to Map the Genes for the Six Major Glycoproteins of Equine Herpesvirus 1. *J. Virol.* 61.8: 2454-61.
- Allen, G.P.; Kydd, J.H.; Slater, J.D. und Smith, K.C.** (1999). Advances in Understanding of the Pathogenesis, Epidemiology and Immunological Control of Equine Herpesvirus Abortion. In: Wernery, U., Wade, J. F., Mumford, J A. und Kaaden, O. R. Equine Infectious Diseases VIII. Proceedings of the Eighth International Conference. Dubai, 23<sup>rd</sup>-26<sup>th</sup> March 1998. R&W Publicaations (Newmarktet) Limited.
- Baines, J.D. und Roizmann, B.** (1991). The Open Reading Frames UL3, UL4, UL10 and UL16 are Dispensable for the Replication of Herpes Simplex Virus 1 in Cell Culture. *J. Virol.* 65, 938-944.
- Baines, J.D. und Roizman, B.** (1992). The UL11 Gene of Herpes Simplex Virus 1 Encodes a Function that Facilitates Nucleocapsid Envelopment and Egress from Cells. *J. Virol.* 66.8: 5168-74.
- Bowles, D.E.; Kim, S.K. und O'Callaghan, D.J.** (2000). Characterization of the Trans-Activation Properties of Equine Herpesvirus 1 EICP0 Protein. *J. Virol.* 74.3: 1200-08.
- Browne, H.; Bell, S.; Minson, T. und Wilson, D.W.** (1996). An Endoplasmic Reticulum-Retained Herpes Simplex Virus Glycoprotein H is Absent from Secreted Virions: Evidence for Reenvelopment During Egress. *J. Virol.* 70.7: 4311-16.
- Browning, G.F.; Ficorilli, N. und Studdert. M.J.** (1988). Asinine Herpesvirus Genomes: Comparison with those of the Equine Eerpesviruses. *Arch. Virol.* 101.3-4: 183-90.
- Bryans, J.T.** (1980). Herpesviral Diseases Affecting Reproduction in the Horse. *Vet. Clin. North Am. Large. Anim. Pract.* 2.2: 303-12.
- Buckmaster, E.A.; Gompels, U. und Minson, A.** (1984). Characterisation and Physical Mapping of an HSV-1 Glycoprotein of Approximately 115 X 10(3) Molecular Weight. *Virology* 139(2): 408-13.
- Campadelli-Fiume, G.; Farabegoli, F.; Di Gaeta, S.; Roizman, B.** (1991). Origin of Unenveloped Capsids in the Cytoplasm of Cells Infected with Herpes Simplex Virus 1. *J. Virol.* 65.3: 1589-95.

**Campbell, M.E. und Preston, C.M.** (1987). DNA Sequences which Regulate the Expression of the Pseudorabies Virus Major Immediate Early Gene. *Virology* 157.2: 307-16.

**Caughman, G.B.; Staczek, J. und O'Callaghan, D.J.** (1985). Equine Herpesvirus Type 1 Infected Cell Polypeptides: Evidence for Immediate Early/Early/Late Regulation of Viral Gene Expression. *Virology* 145.1: 49-61.

**Ciacchi-Zanella, J.; Stone, M.; Henderson, G. und Jones, C.** (1999). The Latency-Related Gene of Bovine Herpesvirus 1 Inhibits Programmed Cell Death. *J. Virol.* 73.12: 9734-40.

**Crabb, B.S.; Nagesha, H.S. und Studdert, M.J.** (1992). Identification of Equine Herpesvirus 4 Glycoprotein G: a Type-Specific, Secreted Glycoprotein. *Virology* 1: 143-154.

**Cranage, M.P.; Smith, G.L.; Bell, S.E.; Hart, H.; Brown, C.; Bankier, A.T.; Tomlinson, P.; Barrell, B.G. und Minson, T.C.** (1988). Identification and Expression of a Human Cytomegalovirus Glycoprotein with Homology to the Epstein-Barr Virus BXLF2 Product, Varicella-Zoster Virus gpIII, and Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein H. *J. Virol.* 62(4): 1416-22.

**Csellner, H.; Wellington, J.E.; Walker, C.; McLure, L.E.; Love, D.N. und Whalley, J.M.** (1999). EHV-1 gD is Essential for Virus Entry and Cell-to-Cell Spread, and a gD Deletion Mutant induces a protective immune response in mice. 24<sup>th</sup> International Herpesvirus Workshop Boston 5.025.

**Cullinane, A.A.; Rixon, F.J. und Davison, A.J.** (1988). Characterization of the Genome of Equine Herpesvirus 1 Subtype 2. *J. Gen. Virol.* 69: ( Pt 7) 1575-90.

**Desai, P.J.; Schaffer, P.A. und Minson, A.C.** (1988). Excretion of Non-Infectious Virus Particles Lacking Glycoprotein H by a Temperature-Sensitive Mutant of Herpes Simplex Virus Type 1: Evidence that gH is Essential for Virion Infectivity. *J. Gen. Virol.* 69 (Pt 6): 1147-56

**Dijkstra, J.M.; Visser, N.; Mettenleiter, T.C. und Klupp, B.G.** (1996). Intracellular Processing of Pseudorabies Virus Glycoprotein M (gM): gM of Strain Bartha Lacks N-Glycosylation. *Virology* 237, 113-122.

**Doms, R.W.; Lamb, R.A.; Rose, J.K. und Helenius, A.** (1993). Folding and Assembly of Viral Membrane Proteins. *Virology* 193.2: 545-62.

**Drummer, H.E.; Studdert, M.J. und Crabb, B.S.** (1998). Equine Herpesvirus-4 Glycoprotein G is Secreted as a Disulphide-Linked Homodimer and is Present as Two Homodimeric Species in the Virion. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 5): 1205-13.

**Dubin, G. und Jiang, H.** (1995). Expression of Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein L (gL) in Transfected Mammalian Cells: Evidence that gL is not Independently Anchored to Cell Membranes. *J. Virol.* 69(7): 4564-8.

**Edington, N.; Bridges, C.G. und Patel, J.R.** (1986). Endothelial Cell Infection and Thrombosis in Paralysis Caused by Equine Herpesvirus-1: Equine Stroke. *Arch. Virol.* 90.1-2: 111-24.

**Engelhardt, T.; Keil, G.M.; Karger, A. und Enz, M.** (1996). Bovine Herpesvirus 1 U(s) Open Reading Frame 4 Encodes a Glycoproteoglycan. *J. Virol.* 70.5: 3032-38.

**Feinberg, A.P. und Vogelstein, B.** (1983). A Technique for Radiolabeling DNA Restriction Endonuclease Fragments to High Specific Activity. *Anal. Biochem.* 132(1): 6-13.

**Flowers, C.C. und O'Callaghan, D.J.** (1992). The Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Homolog of Herpes Simplex Virus Type 1 US9 and the Nature of a Major deletion within the Unique Short Segment of the EHV-1 KyA Strain Genome. *Virology* 190.1: 307-15.

**Foa-Tomasi, L.; Avitabile, E.; Boscaro, A.; Brandimarti, R.; Gualandri, R.; Manservigi, R.; Dall'Olio, F.; Serafini-Cessi, F. und Fiume, G.C.** (1991). Herpes Simplex Virus (HSV) Glycoprotein H is Partially Processed in a Cell Line that Expresses the Glycoprotein and Fully Processed in Cells Infected with Deletion or ts Mutants in the Known HSV Glycoproteins. *Virology*. 180(2): 474-82.

**Frey, H.R.** (2003). Virusabort der Stuten in: Liess, B. und Kaaden (Hrsg.), O.R. Virusinfektionen bei Haus- und Nutztieren. 2. Auflage. Schlütersche GmbH&Co.KG

**Forrester, A.J.; Sullivan, V.; Simmons, A.; Blacklaws, B.A.; Smith, G.L.; Nash, A.A. und Minson, A.C.** (1991). Induction of Protective Immunity with Antibody to Herpes Virus Type 1 Glycoprotein H (gH) and Analysis of the Immune Response to gH Expressed in Recombinant Vaccinia Virus. *J. Gen. Virol.* 72 ( Pt 2): 369-75.

**Forrester, A.; Farrell, H.; Wilkinson, G.; Kaye, J.; Davis-Poynter, N. und Minson, T.** (1992). Construction and Properties of a Mutant of Herpes simplex Virus Type 1 with Glycoprotein H Coding Sequences Deleted. *J. Virol.* 66(1): 341-8.

**Fuchs, W.; Klupp, B.G.; Granzow, H. und Mettenleiter, T.C.** (1997). The UL20 Gene Product of Pseudorabies Virus Functions in Virus Egress. *J. Virol.* 71.7: 5639-46.

**Fuchs, W. und Mettenleiter, T.C.** (1999). DNA Sequence of the UL6 to UL20 Genes of Infectious Laryngotracheitis Virus and Characterisation of the UL10 Gene Product as Anonglycosylated and Nonessential Virion Protein. *J. Gen. Virol.* 80, 2173-2182.

**Fuller, A.O. und Lee, W.C.** (1992). Herpes Simplex Virus Type 1 Entry through a Cascade of Virus-Cell Interactions Requires Different Roles of gD and gH in Penetration. *J. Virol.* 66(8): 5002-12.

**Fuller, A.O. und Spear, P.G.** (1987). Anti-Glycoprotein D Antibodies that Permit Adsorption but Block Infection by Herpes Simplex Virus 1 Prevent Virion-Cell Fusion at the Cell Surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5454-5458.

**Galdiero, M.; Whiteley, A.; Bruun, B.; Bell, S.; Minson, T. und Browne, H.** (1997). Site-Directed and Linker Insertion Mutagenesis of Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein H. *J. Virol.* 71(3):2163-70.

**Gershon, A.A.; Sherman, D.L.; Zhu, Z.; Gabel, C.A.; Ambron, R.T. und Gershon, M.D.** (1994). Intracellular Transport of Newly Synthesized Varicella-Zoster Virus: Final Envelopment in the Trans-Golgi Network. *J. Virol.* 68.10: 6372-90.

- Ghiasi, H.; Kaiwar, R.; Nesburn, A.B. und Wechsler, S.L.** (1992). Baculovirus-Expressed Glycoprotein H of Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) Induces Neutralizing Antibody and Delayed Type Hypersensitivity Responses, but does not Protect Immunized Mice Against Lethal HSV-1 Challenge. *J. Gen. Virol.* 73 ( Pt 3):719-22.
- Ghiasi, H.; Kaiwar, R.; Slanina, S.; Nesburn, A.B. und Wechsler, S.L.** (1994). Expression and Characterization of Baculovirus Expressed Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein L. *Arch. Virol.* 138(3-4):199-212.
- Glorioso, J.; Szczesiul, M.S.; Marlin, S.D. und Levine, M.** (1983). Inhibition of Glycosylation of Herpes Simplex Virus Glycoproteins: Identification of Antigenic and Immunogenic Partially Glycosylated Glycopeptides on the Cell Surface Membrane. *Virology* 126.1: 1-18.
- Gompels, U.A.; Martin, M.E.; Thomson, B.J.; Honess, R.W.; Craxton, M.A.; Liu, M.Y.; Littler, E.; Arrand, J.R.; Teo, I. und Jones, M.D.** (1991). The Genome of Human Herpesvirus 6: Maps of Unit-Length and Concatemeric Genomes for Nine Restriction Endonucleases. *J. Gen. Virol.* 72 ( Pt 1): 157-68.
- Gompels, U.A. und Minson A.** (1986). The Properties and Sequence of Glycoprotein H of Herpes Simplex Virus Type 1. *Virology.* 153(2):230-47.
- Gompels, U.A. und Minson, A.C.** (1989). Antigenic Properties and Cellular Localization of Herpes Simplex Virus Glycoprotein H Synthesized in a Mammalian Cell Expression System. *J. Virol.* 63(11): 4744-55.
- Gompels, U.A.; Craxton, M.A. und Honess, R.W.** (1988). Conservation of Glycoprotein H (gH) in Herpesviruses: Nucleotide Sequence of the gH Gene from Herpesvirus Saimiri. *J. Gen. Virol.* 69 (Pt 11): 2819-29.
- Graham, F.L.; van der Eb, A.J.** (1973). Transformation of Rat Cells by DNA of Human Adenovirus 5. *Virology* 54 (2): 536-9.
- Granzow, H.; Klupp, B.G.; Fuchs, W.; Veits, J.; Osterrieder, N. und Mettenleiter, T.C.** (1997). Ultrastructural Analysis of the Replication Cycle of Pseudorabies Virus in Cell Culture: a Reassessment. *J. Virol.* 71.3: 2072-82.
- Gray, W.L.; Baumann, R.P.; Robertson, A.T.; Caughman, G.B.; O'Callaghan, D.J. und Staczek, J.** (1987). Regulation of Equine Herpesvirus Type 1 Gene Expression: Characterization of Immediate Early, Early, and Late Transcription. *Virology* 158.1: 79-87.
- Hanahan, D. und Meselson, M.** (1983). Plasmid Screening at high Colony Density. *Methods Enzymol.* 100:333-42.
- Heineman, T.; Gong, M.; Sample, J. und Kieff, E.** (1988). Identification of the Epstein-Barr Virus gp85 gene. *J. Virol.* 65: 1101-1107.
- Henry, B.E.; Robinson, R.A.; Dauenhauer, S.A.; Atherton, S.S.; Hayward, G.S. und O'Callaghan, D.J.** (1981). Structure of the Genome of Equine Herpesvirus Type 1. *Virology* 115.1: 97-114.

- Honess, R.W. und Roizman, B.** (1974). Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J. Virol.* 14.1: 8-19.
- Hutchinson, L.; Browne, H.; Wargent, V.; Davis-Poynter, N.; Primorac, S.; Goldsmith, K.; Minson, A.C. und Johnson, D.C.** (1992). A Novel Herpes Simplex Virus glycoprotein, gL, Forms a Complex with Glycoprotein H (gH) and Affects Normal Folding and Surface Expression of gH. *J. Virol.* 1992 66(4):2240-50.
- Hutchinson, L. und Johnson, D.C.** (1995). Herpes Simplex Virus Glycoprotein K Promotes Egress of Virus Particles. *J. Virol.* 69.9: 5401-13.
- Johnson, D.C.; Webb, M.; Wisner, T.W. und Brunetti, C.** (2001). Herpes Simplex Virus gE/gI Sorts Nascent Virions to Epithelial Cell Junctions, Promoting Virus Spread. *J. Virol.* 75.2: 821-33.
- Johnson, D.C. und Huber, M.T.** (2002). Directed Egress of Animal Viruses Promotes Cell-to-Cell Spread. *J. Virol.* 76.1: 1-8.
- Karger, A. und Mettenleiter, T.C.** (1993). Glycoproteins gIII and gp50 Play Dominant Roles in the Biphasic Attachment of Pseudorabies Virus. *Virology* 194.2: 654-64.
- Keller, P.M.; Davison, A.J.; Lowe, R.S.; Riemen, M.W. und Ellis, R.W.** (1987). Identification and Sequence of the Gene Encoding gpIII, a Major Glycoprotein of Varicella-Zoster Virus. *Virology* 157(2): 526-33.
- Khattar, S.K.; van Drunen Littel-van den Kark. S.; Attah-Poku, S.K.; Babiuk, L.A. und Tikoo, S.K.** (1996). Identification and Characterisation of a Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) Glycoprotein L which is Required for Proper Antigenicity, Processing, and Transport of BHV-1 Glycoprotein H. *Virology* 1; 219 (1): 66-76.
- Klupp, B.G. und Mettenleiter, T.C.** (1991). Sequence and Expression of the Glycoprotein gH Gene of Pseudorabies Virus. *Virology.* 182(2):732-41.
- Klupp, B.G.; Visser, N. und Mettenleiter, T.C.** (1992). Identification and Characterisation of Pseudorabies Virus Glycoprotein H. *J. Virol.* 3048-3055.
- Klupp, B.G.; Baumeister, J.; Karger, A.; Visser, N. und Mettenleiter, T.C.** (1994). Identification and Charakterisation of a Novel Structural Glycoprotein in Pseudorabies Virus, gL. *J. Virol.* 3868-3878.
- Klupp, B.G.; Fuchs, W.; Weinland, E.; und Mettenleiter, T.C.** (1997). Pseudorabies Virus Glycoprotein L is Necessary for Virus Infectivity but Dispendable for Virion Lokalisation of Glycoprotein H. *J. Virol.* 7687-7695.
- Kousoulas, K.G.; Bzik, D.J.; DeLuca, N. und Person, S.** (1983). The Effect of Ammonium Chloride and Tunicamycin on the Glycoprotein Content and Infectivity of Herpes Simplex Virus Type 1. *Virology* 125.2: 468-74.

- Kukreja, A.; Love, D.N.; Whalley, J.M. und Field H.J.** (1998). Study of the Protective Immunity of Co-Expressed Glycoprotein H and L of Equine Herpesvirus-1 in a Murine Intranasal Infection Model. *Vet. Microbiol.* 15; 60 (1): 1-11.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 *Nature* 15; 227 (259): 680-5.
- Learmonth, G.S.; Love, D.N.; Gilkerson, J.R.; Wellington, J.E. und Whalley, J.M.** (2003). Inoculation with DNA Encoding the Glycoprotein gp2 Reduces Severity of Equine Herpesvirus 1 Infection in a Mouse Respiratory Model. *Arch Virol.* 148(9): 1805-13.
- Ligas, M.W. und Johnson, D.C.** (1988). A Herpes Simplex Virus Mutant in which Glycoprotein D Sequences are Replaced by Beta-Galactosidase Sequences Binds to but is Unable to Penetrate into Cells. *J. Virol.* 62.5: 1486-94.
- MacLean, C.A.; Efstathiou, S.; Elliott, M.L.; Jamieson, F.E. und McGeoch, D.J.** (1991). Investigation of Herpes Simplex Virus type 1 Genes Encoding Multiply Inserted Membrane Proteins. *J. Gen. Virol.* 72 (Pt 4): 897-906.
- Matsumura, T.; O'Callaghan, D.J.; Kondo, T. und Kamada, M.** (1996). Lack of Virulence of the Murine Fibroblast Adapted Strain, Kentucky A (KyA), of Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) in Young Horses. *Vet. Microbiol.* 48.3-4: 353-65.
- Matsumura, T.; Kondo, T.; Sugita, S.; Damiani, A.M.; O'Callaghan, D.J. und Imagawa, H.** (1998). An Equine Herpesvirus Type 1 Recombinant with a Deletion in the gE and gI Genes is Avirulent in Young Horses. *Virology* 242.1: 68-79.
- McGeoch, D.J.; Dalrymple, M.A.; Davison, A.J.; Dolan, A.; Frame M.C.; McNab D.; Perry, L.J.; Scott, J.E. und Taylor P.** (1988). The complete DNA Sequence of the Long Unique Region in the Genome of Herpes Simplex Virus Type 1. *J. Gen. Virol.* 69 (Pt 7): 1531-74.
- McGeoch, D.J. und Davison, A.J.** (1986). DNA Sequence of the Herpes Simplex Virus Type 1 Gene Encoding Glycoprotein gH, and Identification of Homologues in the Genomes of Varicella-Zoster Virus and Epstein-Barr Virus. *Nucleic. Acids. Res.* 27;14(10): 4281-92.
- McGowan, E.M.; Hayden, M.B.; Edwards, S.J.; Pye, D.; Love, D.N. und Whalley, J.M.** (1994). Expression and Characterisation of Equine Herpesvirus 1 Glycoprotein H Using a Recombinant Baculovirus. *J. Gen. Virol.* 137 (3-4): 389-395.
- Meredith, D.M.; Stocks, J.M.; Whittaker, G.R.; Halliburton, I.W.; Snowden, B.W. und Killington, R.A.** (1989). Identification of the gB Homologues of Equine Herpesvirus Types 1 and 4 as Disulphide-Linked Heterodimers and their Characterization Using Monoclonal Antibodies. *J. Gen. Virol.* 1989;70 (Pt 5): 1161-72.
- Mettenleiter, T.C.; Zsak, L.; Zuckermann, F.; Sugg, H.; Kern, H. und Ben-Porat, T.** (1990). Interaction of Glycoprotein gIII with a Cellular Heparinlike Substance Mediates Adsorption of Pseudorabies Virus. *J. Virol.* 64.1: 278-86.
- Mettenleiter, T. C.** (2002). Herpesvirus Assembly and Egress. *J. Virol.* 76.4: 1537-47.



- Meyer, A.L.; Petrovskis, E.A.; Duffus, W.P.; Thomsen, D.R. und Post, L.E.** (1991). Cloning and Sequence of an Infectious Bovine Rhinotracheitis virus (BHV-1) gene homologous to Glycoprotein H of Herpes Simplex Virus. *Biochim. Biophys. Acta.* 8; 1090(2): 267-9.
- Meyer, G.; Hanon, E.; Georlette, D.; Pastoret, P.-P. und Thiry, E.** (1998). Bovine Herpesvirus Type 1 Glycoprotein H is Essential for Penetration and Propagation in Cell Culture. *J. Gen. Virol.* 79, 1983-1987.
- Murphy, F.A.** (1990). Virus Taxonomy, 9-35. In: Fields, B.N.; Knipe, D.M. et al. (Eds.): *In: Virology*, Vol. 1, Raven-Press, New York.
- Murphy, F.A.; Gibbs, E.P.; Horzinek, M.C. und Studdert, M.J.** (1999). *Veterinary Virology*. 3<sup>rd</sup> Edition. Academic Press.
- Neubauer, A.; Beer, M.; Brandmuller, C.; Kaaden, O.R. und Osterrieder, N.** (1997). Analysis of the Contributions of the Equine Herpesvirus 1 Glycoprotein gB Homolog to Virus Entry and Direct Cell-to-Cell Spread. *Virology* 227.2: 281-94.
- Nicolson L.; Cullinane A.A. und Onions D.E.** (1990). The Nucleotide Sequence of the Equine Herpesvirus 4 Thymidine Kinase Gene. *J. Gen. Virol.* 71 (Pt 8): 1801-5.
- Osterrieder, N.; Neubauer, A.; Brandmuller, C.; Braun, B.; Kaaden, O.R. und Baines, J.D.** (1996). The Equine Herpesvirus 1 Glycoprotein gp21/22a, the Herpes Simplex Virus Type 1 gM Homolog, is Involved in Virus Penetration and Cell-to-Cell Spread of Virions. *J. Virol.* 70.6: 4110-15.
- Osterrieder, N.** (1999). Construction and Characterization of an Equine Herpesvirus 1 Glycoprotein C Negative Mutant. *Virus Res.* 59.2: 165-77.
- Peeters, B., de Wind, N.; Broer, R.; Gielkens, A. und Moormann, R.** (1992). Glycoprotein H of Pseudorabies Virus is Essential for Entry and Cell-to-Cell Spread of the Virus. *J. Virol.* 66.6: 3888-92.
- Peng, T.; Ponce de Leon, M.; Novotny, M.J.; Jiang, H.; Lambris, J.D.; Dubin, G.; Spear, P.G.; Cohen, G.H. und Eisenberg, R.J.** (1998a). Structural and Antigenic Analysis of a Truncated Form of the Herpes Simplex Virus Glycoprotein gH-gL Complex. *J. Virol.* 72(7): 6092-103.
- Peng, T.; Ponce de Leon, M.; Jiang, H.; Dubin, G.; Lubinski, J.M.; Eisenberg, R.J. und Cohen, G.H.** (1998b). The gH-gL Complex of Herpes Simplex Virus (HSV) Stimulates Neutralizing Antibody and Protects Mice Against HSV Type 1 Challenge. *J. Virol.* 72(1): 65-72.
- Perng, G.C.; Dunkel, E.C.; Geary, P.A.; Slanina, S.M.; Ghiasi, H.; Kaiwar, R.; Nesburn, A.B. und Wechsler, S.L.** (1994). The Latency-Associated Transcript Gene of Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) is required for efficient in Vivo Spontaneous Reactivation of HSV-1 from Latency. *J. Virol.* 68.12: 8045-55.
- Perng, G.C.; Slanina, S.M.; Yukht, A.; Ghiasi, H.; Nesburn, A.B.; Wechsler, S.L.** (2000). The Latency-Associated Transcript Gene Enhances Establishment of Herpes Simplex Virus Type 1 Latency in Rabbits. *J. Virol.* 74.4: 1885-91.

- Poffenberger, K.L. und Roizman, B.** (1985). A Noninverting Genome of a viable Herpes Simplex Virus 1: Presence of Head-to-Tail Linkages in Packaged Genomes and Requirements for Circularization after Infection. *J. Virol.* 53.2: 587-95.
- Rauh, I. und Mettenleiter, T.C.** (1991). Pseudorabies Virus Glycoproteins gII and gp50 are Essential for Virus Penetration. *J. Virol.* 65.10: 5348-56.
- Reynolds, J.A. und Tanford, C.** (1970a). Binding of Dodecyl Sulfate to Proteins at High Binding Ratios. Possible Implications for the State of Proteins in Biological Membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 66 (3): 1002-7.
- Reynolds, J.A. und Tanford, C.** (1970b). The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. *J. Biol. Chem.* 245 (19): 5161-5.
- Robbins, A.K.; Dorney, D.J.; Wathen, M.W.; Whealy, M.E.; Gold, C.; Watson, R.J.; Holland, L.E.; Weed, S.D.; Levine, M.; Glorioso, J.C.** (1987). The Pseudorabies Virus gII Gene is Closely Related to the gB Glycoprotein Gene of Herpes Simplex Virus. *J. Virol.* 61.9: 2691-701.
- Roberts, T.M.; Longnecker, R.; Druker, B. und Kieff, E.** (1991). An Epstein-Barr Virus Protein Associated with Cell Growth Transformation Interacts with a Tyrosine Kinase. *J. Virol.* 65(7): 3681-92.
- Robertson, G.R.; Scott, N.A.; Miller, J.M.; Sabine, M.; Zheng, M.; Bell, C.W.; Whalley, J.M.** (1991). Sequence Characteristics of a Gene in Equine Herpesvirus 1 Homologous to Glycoprotein H of Herpes Simplex Virus. *DNA Seq.* 1(4): 241-9.
- Roizman, B.** (1981). Herpesviridae. Definition, Provisional Nomenclature, and Taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses *Intervirology* 16.4: 201-17.
- Roizman, B. und Sears, A.A.** (1996). Herpes Simplex Viruses and Their Replication. In: Fields, B.N., Knipe, D.M. Howley, P.M. (Hrsg.): *Fields Virology*. 3. Aufl., Lippincott-Raven Press, Ltd., New York.
- Roizman, B. und Knipe, D.M.** (2001). Herpesviridae. In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (ed) *Fields Virology*, Vol. 2 4<sup>th</sup> edn., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp 2381-2398.
- Roizman, B. und Pellet, P.E.** (2001). Herpesviridae. In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (ed) *Fields Virology*, Vol. 2 4<sup>th</sup> edn., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp 2381-2398.
- Roop, C.; Hutchinson, L. und Johnson, D.C.** (1993). A Mutant Herpes Simplex Virus Type 1 Unable to Express Glycoprotein L cannot Enter Cells, and Its Particles Lack Glycoprotein H. *J. Virol.* 67(4): 2285-97.
- Rudolph, J. und N. Osterrieder.** (2002) . Equine Herpesvirus Type 1 Devoid of gM and gp2 is Severely Impaired in Virus Egress but not Direct Cell-to-C Spread. *Virology* 293.2: 356-67.

- Saiki, R.K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K.B.; Horn, G.T.; Erlich, H.A. und Arnheim, N.** (1995). Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* 230(4732): 1350-4.
- Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B. und Erlich, H.A.** (1988). Primer-Directed Enzymatic Mmplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239 (4839): 487-91.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** (1989).Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2. Auflage.
- Scott, J.C., Dutta, S.K. und Myrup, A.C.** (1983). In Vivo Harboring of Equine Herpesvirus-1 in Leukocyte Populations and Subpopulations and their Quantitation from Experimentally Infected Ponies. *Am. J. Vet .Res.* 44.7: 1344-48.
- Showalter, S.D.; Zweig, M. und Hampar, B.** (1981). Monoclonal Antibodies to Herpes Simplex Virus Type 1 Proteins, Including the Immediate-Early Protein ICP 4. *Infect Immun.* 34(3): 684-92.
- Shukla, D. und Spear, P.G.** (2001). Herpesviruses and Heparan Sulfate: an Intimate Relationship in Aid of Viral Entry. *J. Clin. Invest.* 108.4: 503-10.
- Skepper, J.N.; Whiteley, A.; Browne, H. und Minson, A.** (2001). Herpes Simplex Virus Nucleocapsids Mature to Progeny Virions by an Envelopment --> Deenvelopment --> Reenvelopment Pathway. *J. Virol.* 75.12: 5697-702.
- Simmons, A. und Nash, A.A.** (1985). Role of Antibody in Primary and Recurrent Herpes Simplex Virus Infection. *J. Virol.* 53(3): 944-8.
- Slater, J.D.; Tewari, D.; Gibson, J.S.; Field, H.J.; Ludwig, H.; Steinbach, F. und Borchers, K.** (1994). Experimental Infection of Specific Pathogen-Free Ponies with Equine Herpesvirus-1: Detection of Infectious Virus and Viral DNA. *In: Proceedings of the 7th international Conference of equine infectious disease.* Ed.: W. Plowright and H. Nakajima, R&W Publications (Newmarket), pp 255-260.
- Smith, R.H.; Caughman, G.B. und O'Callaghan, D.J.** (1992). Characterization of the Regulatory Functions of the Equine Herpesvirus 1 Immediate-Early Gene Product. *J. Virol.* 66.2: 936-45.
- Sodeik, B.; Ebersold, M.W. und Helenius, A.** (1997). Microtubule-Mediated Transport of Incoming Herpes Simplex Virus 1 Capsid to the Nucleus. *J. Cell. Biol.* 136, 1007-1021.
- Spear, P. G.** (1993a). Entry of Alphherpesviruses into Cells. Seminar in *Virology* 4, 167-180.
- Spear, P. G.** (1993b). Membranen Fusion Induced by Herpes Simplex Virus, 201-232. *In: J. Bentz (Eds.), Viral Fusion Mechanismus,.* CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.
- Spear, P.G.; Eisenberg, R.J. und Cohen, G.H.** (2000). Three Classes of Cell Surface Receptors for Alphaherpesvirus Entry. *Virology* 275.1: 1-8.

- Stokes, A.; Alber, D.G.; Greensill, J.; Amellal, B.; Carvalho, R.; Taylor, L.A.; Doel, T.R.; Killington, R.A.; Halliburton, I.W. und Meredith, D.M.** (1996). The Expression of the Proteins of Equine Herpesvirus 1 which Share Homology with Herpes simplex Virus 1 Glycoproteins H and L. *Virus Res.* 40.1: 91-107.
- Sun, Y.; MacLean, A.R.; Aitken, J.D. und Brown, S.M.** (1996). The Role of the Gene 71 Product in the Life Cycle of Equine Herpesvirus 1. *J. Gen. Virol.* 77 (Pt 3): 493-500.
- Sutton, G. A. Viel, L.; Carman, P.S. und Boag, B.L.** (1998). Pathogenesis and Clinical Signs of Equine Herpesvirus-1 in Experimentally Infected Ponies in vivo. *Can. J. Vet. Res.* 62.1: 49-55.
- Telford, E.A.; Watson, M.S.; Mc Bride, K. und Davison, A.J.** (1992). The DNA Sequence of Equine Herpesvirus-1. *Virology* 189.1: 304-16.
- Telford, E.A.; Watson, M.S.; Perry, J.; Cullinane, A.A. und Davison, A.J.** (1998). The DNA Sequence of Equine Herpesvirus-4. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 5): 1197-203.
- Van Drunnen Littel-van den Hurk, S.; Khattar, S.; Tikoo, S.K.; Babiuk, L.A. und Baranowski, E.** (1996). Glycoprotein H (gH/gp108) and Glycoprotein L Form a Functional Complex which Plays a Role in Penetration, but not in Attachment, of Bovine Herpesvirus 1. *J. Gen. Virol.* 77: 1515-1520.
- Van Regenmortel et al. 2227-32.** (1990). Virus Taxonomy. In: Fields, (Eds.): *Virology* Vol.1, 9-35, Raven-Press, New York.
- Van Regenmortel, M.H.; Mayo, M.A.; Fauquet, C.M.; Maniloff, J.** (2000). Virus Nomenclature: Consensus Versus Chaos *Arch. Virol.* 145.10: 2227-32.
- Varmuza, S.L. und Smiley, J.R.** (1985). Signals for Site-Specific Cleavage of HSV DNA: Maturation Involves Two Separate Cleavage Events at Sites Distal to the Recognition Sequences. *Cell* 41.3: 793-802.
- Weber, K. und Osborn, M.** (1969). The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 25; 244(16): 4406-12.
- Weller, S.K.; Aschman, D.P.; Sacks, W.R.; Coen, D.M.; Schaffer, P.A.** (1983). Genetic Analysis of Temperature-sensitive Mutants of HSV-1: the Combined Use of Complementation and Physical Mapping for Cistron Assignment. *Virology.* 30; 130(2): 290-305.
- Whealy, M.E.; Card, J.P.; Meade, R.P.; Robbins, A.K. und Enquist, L.W.** (1991). Effect of Brefeldin A on Alphaherpesvirus Membrane Protein Glycosylation and Virus Egress. *J. Virol.* 65.3: 1066-81.
- Whalley, J.M.; Robertson, G.R. und Davison, A.J.** (1981). Analysis of the Genome of Equine Herpesvirus Type 1: Arrangement of Cleavage Sites for Restriction Endonucleases EcoRI, BglII and BamHI. *J. Gen. Virol.* 57.(Pt 2): 307-23.

**Whiteley, A.; Bruun, B.; Minson, T. und Browne, H.** (1999). Effects of Targeting Herpes Simplex Virus Type 1 gD to the Endoplasmic Reticulum and Rrans-Golgi Network. *J. Virol.* 73.11: 9515-20.

**Whittaker, G.R.; Riggio, M.P.; Halliburton, I.W.; Killington, R.A.; Allen, G.P. und Meredith, D.M.** (1991). Antigenic and Protein Sequence Homology Between VP13/14, a Herpes Simplex virus Type 1 Tegument Protein, and gp10, a Glycoprotein of Equine Herpesvirus 1 and 4. *J. Virol.* 65(5): 2320-6.

**Wilks, C.R. und Studdert, M.J.** (1976). Equine Herpesviruses. 6. Sequential Infection of Horses with Types 2, 3 and 1. *Aust. Vet. J.* 52.5: 199-203.

**Wilson,D.W.; Davis-Poynter,N.; Minson,A.C.** (1994). Mutations in the Cytoplasmic Tail of Herpes Simplex Virus Glycoprotein H Suppress Cell Fusion by a Syncytial Strain. *J. Virol.* 68(11): 6985-93.

**Wu, P.; Reed, W.M.; Yoshida, S.; Sui, D. und Lee, L.F.** (1999). Identification and Characterization of Glycoprotein H of MDV-1 GA Strain. *Acta Virol.* 43(2-3): 152-8.

**WuDunn, D. und Spear, P.G.** (1989). Initial Interaction of Herpes Simplex Virus with Cells is Binding to Heparan Sulfate. *J. Virol.* 63.1: 52-58.

## 8 Anhang

### 8.1 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillata
Amp.	Ampicillin
Amper	Ammoniumpersulfat
AHV-1 bis 3	asine Herpesvirus Typ 1 bis 3
AS	Aminosäuren
$\alpha$ -TIF	$\alpha$ -Gen induzierende Faktor
BAC	bacterial artificial chromosome
BHV-1	bovines Herpesvirus Typ 1
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Kapazität
ca.	circa
°C	Grad Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CaPO <sub>4</sub>	Calciumphosphat
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Da	Dalton
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	3'-desoxy-Ribonukleosid-5'-triphosphat

---

dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
dUTP	Desoxy-Uridintriphosphat
E	“ <i>early</i> ”
EBV	Ebstein-Barr-Virus
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
Edmin 337	equine Hautzelllinie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHV-1 bis -5	equines Herpesvirus Typ 1 bis Typ 5
Endo H	Endoglykosidase H
ENS	Schweinenierenzellen
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i> ,	und andere Autoren
F	Farad
Fa.	Firma
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
g(p)	Glykoprotein
GFP	“ <i>green fluorescent protein</i> ”
h	Stunde
HCMV	humanes Cytomegalovirus
HBS	Hepes gepufferte Saline
HCl	Salzsäure
HHV-6	humanen Herpesvirus Typ 6
HLgR	“ <i>herpesvirus immunoglobulin-like receptor</i> ”
Hve A-D	“ <i>herpesvirus entry mediator</i> ”
HVS	Herpesvirus Saimiri
HSV-1 und 2	Herpes simplex Virus Typ 1 und Typ 2
IAC	Isoamylalkohol-Chloroform-Gemisch
ICP	infected cell protein
IE	“ <i>immediate early</i> ”
IIF	indirekte Immunfluoreszenz
ILTV	infektiöses Laryngotracheitis Virus
IPTG	Isopropyl- $\alpha$ -D-thiogalactosid

---

IR	<i>internal repeat</i>
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
L	late
l	Liter
<i>lacZ</i>	$\beta$ -Galactosidase-Gen
LAT	<i>latency associated transcript</i>
LB	Luria Bertoni
LiCl	Lithiumchlorid
m	Milli
$\mu$	Mikro
M	molar
MAk	monoklonaler Antikörper
mbar	Millibar
MDBK	-Zellen
MDV	Marek's Disease Virus
$Mg^{2+}$	Magnesium
MgCl	Magnesiumchlorid
min	Minute
mind.	mindestens
MOI	multiplicity of infection
Mr	Molekulargewicht
mRNS	messenger RNS
nm	Nanometer
N	normal
N-	an Stickstoff gebunden
O-	an Sauerstoff gebunden
ODx	optische Dichte bei x nm Wellenlänge gemessen
OH-	an Hydroxylgruppe gebunden
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
$\sigma$	Widerstand
PAA	Phosphonoessigsäure



---

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PbE	Plaque-bildende Einheiten
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia Hydrogenium
p.i.	post infectionem
PI	Propidiumjodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNGase F	N-Glykosidase F
POD	Peroxidase
PRV	Pseudorabies virus
Rk13	Zelllinie aus Kaninchennierenzellen
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
s.	siehe
SDS	Natiumdodecylsulfat
s.o.	siehe oben
sog.	so genannt
SSC	Standard Saline Citrate
STV	Saline-Trypsin-Versene-Lösung
<i>syn.</i>	synzytial (e, es)
Tab.	Tabelle
TBS-T	Tris-gepufferte Saline mit Tween20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TR	<i>terminal repeat</i>
U	Unit (Einheit)
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
ts	temperatursensitiv
U/min	Umdrehungen pro Minute

UL	Unique-long-Region
US	Unique short - Region
UV	ultraviolett
V	Volt
v / v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
Vero	Nierenzelllinie der grüne Meerkatze
<i>vhs</i>	<i>virion host shutoff-Protein</i>
VP	Virus-Protein
VZV	Varizella Zoster Virus
W	Watt
w / v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-b-D-Galactosid
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
zpE	zytopathischer Effekt

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. R. O. Kaaden für die freundliche Aufnahme an seinem Institut und für die hervorragende Unterstützung bei der Doktorarbeit bedanken.

Frau Dr. A. Neubauer danke ich für die Betreuung und die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und für die große Geduld.

Besonders danken möchte ich Frau Christine Brandmüller für ihre Engelsgeduld und ihr großes Engagement, nicht nur bei der Einführung in die molekularbiologischen Arbeitstechniken, sondern ganz besonders auch in ihrer Eigenschaft als „gute Seele“ der Isolierstation, für die vielen aufbauenden Worte bei den immer wieder auftretenden technischen und sonstigen Problemen während der Durchführung der Doktorarbeit und für die stets freundliche Arbeitsatmosphäre.

Darüber hinaus möchte ich mich ganz herzlich bei allen Mitarbeitern des Instituts bedanken, die durch ihre Unterstützung während meiner Zeit als Doktorandin zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

# **Lebenslauf**

Name	Claudia Pace
Geburtsdatum	27.05.1974
Geburtsort	Castrovillari (CS), Italien
Familienstand	ledig
Anschrift	Giechstr. 53 81249 München
Telefon	(089) 719 44 76
Staatsangehörigkeit	Italienisch

## **Schulbildung**

1980-1985	Grundschule, Castrovillari
1985-1988	Hauptschule, Castrovillari
1988-1993	Gymnasium, Castrovillari
Aug. 1993	Abschluss: ABITUR

seit November 1993  
in Deutschland

## **Studium**

1995 - 2001	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
9. September 2001	Tierärztliche Prüfung an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
seit Dezember 2001	Dissertationsarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztliche Fakultät, München
4. Februar 2002	Approbation als Tierärztin
Juni 2002 - April 2004	Stipendium zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses der Ludwig-Maximilians-Universität, München